

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Th. M. Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps- Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg



Transkriptionelle Regulation mitogener „Immediate early“- Gene im Pankreaskarzinom

Inaugural- Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)
dem Fachbereich Medizin der Philipps- Universität Marburg

vorgelegt von
Katrín Schlengemann aus Wiesbaden
Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps- Universität Marburg
am: 15. 12. 2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Herr PD Dr. V. Ellenrieder
1. Korreferent:	Herr Prof. Dr. P. Langer
2. Korreferent:	Herr PD Dr. W. Meißner

**„Zweifeln wir an der Power,
dann powern wir nur unsere Zweifel“**

(„Einfach sein“, Die Fantastischen Vier)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Das Pankreaskarzinom	8
1.2. Die Pankreaskarzinogenese, ein Tumorprogressionsmodell	9
1.3. Mitogene Kaskaden in der Pankreaskarzinogenese	10
1.3.1. Ras- abhängige mitogene Kaskaden	10
1.3.1.1. Die Ras- Raf- MEK- ERK- Kaskade	12
1.3.2. Ras- unabhängige mitogene Kaskaden	13
1.3.2.1. Die Calcium-/ Calcineurin- Kaskade	13
1.4. Mitogene Transkriptionsfaktoren- die Gruppe der „Immediate early“- Gene	15
1.4.1. Der Transkriptionsfaktor c- myc	16
1.4.2. Der Transkriptionsfaktor Egr- 1	18
1.4.3. Die Transkriptionsfaktoren c- jun und c- fos	19
1.5. Ziel dieser Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Zellkultur	21
2.2. Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	22
2.3. Zelltransfektion	23
2.3.1. Transiente Transfektion von DNA	24
2.3.2. Transiente Transfektion von siRNA	24
2.3.2.1. Transfektionsreagenz: siLentFect	25
2.3.2.2. Transfektionsreagenz: TransMessenger	25
2.4. Zellbehandlungen	26
2.4.1. Der indirekte ERK- Inhibitor U0126	26
2.4.2. Der Calcineurin- Inhibitor Cyclosporin A (CsA)	27
2.5. Luziferase Reporter Gen Assay	27
2.5.1. Calcineurin- Assay	30
2.6. RNA- Analyse	31

2.6.1. RNA- Extraktion	31
2.6.2. cDNA- Synthese (complementary- DNA- Synthese)	31
2.6.3. Quantitative Real Time- PCR	32
2.7. Proteinanalyse	33
2.7.1. Proteinextraktion	33
2.7.1.1. Gesamtzelllysate	33
2.7.1.2. Nukleäres Zelllysate	34
2.7.2. Proteinkonzentrationsbestimmung der Zelllysateproben	35
2.7.3. SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese	36
2.7.4. Western Blot	38
2.7.4.1. „Elektro- Tank- Blotting“	38
2.7.4.2. Entfernung gebundener Primärantikörper von NC- Membranen („Strippen“)	41
2.7.5. DNA- Pulldown- Assay	41
2.8. Funktionelle Assays	43
2.8.1. Durchflusszytometrie	43
2.8.2. Proliferations- Assay	44
2.9. Immunfluoreszenzfärbung	44
3. Ergebnisse	47
3.1. Wachstums- und Proliferationsanalysen im Zellsystem des Pankreaskarzinoms	47
3.1.1. Proliferationsanalysen unter dem Aspekt des Serumeinflusses	47
3.1.2. Zellzyklusanalysen unter dem Aspekt des Serumeinflusses	48
3.1.2.1. Zellzyklusanalyse unter den Konditionen einer zeitkinetischen Serumstimulation	49
3.1.2.2. Der Einfluss von Serum auf die Expression zellzyklusregulierender Proteine	50
3.1.3. Der Einfluss von Serum auf die Expression von „Immediate early“- Transkriptionsfaktoren	52

3.1.3.1. Untersuchungen zur Regulierbarkeit von „Immediate early“- Genen unter Serumeinfluss auf RNA- Ebene	52
3.1.3.2. Untersuchungen zur Regulierbarkeit von „Immediate early“- Genen unter Serumeinfluss auf Protein- Ebene	55
3.1.4. Funktionelle Auswirkungen der Serum- veranlassten Induktion von „Immediate early“- Genen auf die Zellproliferation	56
3.2. Signalkaskaden zur Serum- abhängigen Wachstumsregulation im Pankreaskarzinom unter Einfluss des „Immediate early“- Gens c- myc	58
3.2.1. Der Einfluss von Serum auf die Aktivität der Calcium- abhängigen Phosphatase Calcineurin	60
3.2.2. Der Einfluss von Serum auf Calcium als primärer Botenstoff („first messenger“)	62
3.3. Transkriptionelle Ereignisse in der Calcineurin- abhängigen Induktion des „Immediate early“- Gens c- myc	62
3.3.1. Untersuchungen zur Serum- Stimulierbarkeit des Transkriptionsfaktors NFAT	63
3.3.1.1. Fluoreszenz- mikroskopische Untersuchungen von NFAT nach Serumbehandlung	63
3.3.1.2. Untersuchungen von NFAT auf Proteinebene nach Serumbehandlung	65
3.3.1.3. Betrachtung des DNA- Affinitätsverhaltens von NFAT unter dem Einfluss von Serum	66
3.3.1.4. Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Signalkaskaden auf den Transkriptionsfaktor NFAT	68
3.4. Promotoranalysen unter der Stimulation mit Serum	70
3.4.1. Untersuchungen zum Verhalten von NFAT an seiner DNA- Konsensussequenz unter Stimulation mit Serum	70
3.4.2. Strukturuntersuchungen des c- myc- Promotors unter dem Aspekt der Serum- Induzierbarkeit	72
3.4.2.1. Die Rolle der Calcium-/ Calcineurin- Kaskade in der c- myc- Induktion über die TIE- Region des- c- myc- Promotors	75

3.4.2.2. Die Rolle von NFAT in der Serum regulierten c- myc- Induktion über die TIE- Region des- c- myc- Promotors _____	77
3.4.3. Der Einfluss des Transkriptionsfaktors NFAT auf die Expression des „Immediate early“- Gens c- myc _____	79
3.4.4. Proliferationsanalysen zur Beurteilung der Relevanz des Transkriptionsfaktors NFAT für das Wachstumsverhalten von Pankreaskarzinomzellen _____	81
4. Diskussion _____	83
4.1. Darstellung des Serum- vermittelten Wachstumsverhalten im Zellsystem des Pankreaskarzinoms unter der Regulation des „Immediate early“- Gens c- myc ____	83
4.2. NFAT als Vermittler transkriptioneller Ereignisse in der Calcium-/ Calcineurin-abhängigen Induktion des „Immediate early“- Gens c- myc _____	87
4.3. Bedeutung und Ausblick _____	94
5. Zusammenfassung _____	97
5.1. Zusammenfassung _____	97
5.2. Abstract _____	99
6. Literaturverzeichnis _____	101
7. Anhang _____	111
7.1. Abbildungsverzeichnis _____	111
7.2. Tabellenverzeichnis _____	113
7.3. Abkürzungsverzeichnis _____	114
7.4. Verzeichnis der akademischen Lehrer _____	119
7.5. Danksagung _____	121
7.6. Ehrenwörtliche Erklärung _____	123

1. Einleitung

1.1. Das Pankreaskarzinom

Das duktale Adenokarzinom bildet mit 90 % den histologisch häufigsten bösartigen Tumor des Pankreas (Pellegata et al 1994). Mit einer Inzidenz von 9- 10 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern in Europa und Nordamerika zählt das Pankreaskarzinom zur fünfthäufigsten tumorbedingten Todesursache in der westlichen Welt (Rosewicz and Wiedenmann 1997) und bildet nach dem Kolon- und Magenkarzinom den dritthäufigsten Tumor des Gastrointestinaltraktes. Das Manifestationsalter des Pankreaskarzinoms liegt vorwiegend im höheren Lebensalter zwischen dem 60. und 65. Lebensjahr (Yeo et al. 2002). Als Risikofaktoren, die für die Entstehung des Pankreaskarzinoms prädisponierend zu sein scheinen, zählen familiäre Dispositionen, fortgeschrittenes Alter, chronische Pankreatitis, Leberzirrhose, Diabetes mellitus, Adipositas, Nikotin- und Alkoholabusus (Greer et al. 2007, Lowenfels et al. 1993, Howe et al.1991, Chowdhury et al. 2002, Cancer Facts and Figures 2007). Charakteristisch für neoplastische Ereignisse des Pankreas sind sein aggressives Wachstumsverhalten, das sich durch eine sehr frühzeitige Invasion peripankreatischer Lymphgefäße und Perineuralscheiden auszeichnet und anfangs meist unspezifische und symptomlose Verläufe zeigt. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt dadurch die Möglichkeit zu kurativ operativen Therapieansätzen bei lokal begrenztem Tumorbefund lediglich noch bei 10- 20 % (Rosewicz und Wiedenmann 1997, Yeo et al. 2002). Alternative Behandlungen mit kurativem Erfolg sind für das Pankreaskarzinom neben der Operation auf Grund seiner weitestgehenden Strahlen- und Chemoresistenz kaum gegeben (Lionetto et al. 1995). Das mediane Überleben dieser malignen Erkrankung mit inoperablen Stadien liegt bei 4- 6 Monaten (Greer et al. 2007). Alle Stadien des Pankreaskarzinoms zusammengefasst erreichen eine Fünf-Jahres- Überlebensrate von 4 %. Beschränkt man sich auf die Tumore, welche operabel sind, steigt die Fünf- Jahres- Überlebensrate auf bis das Zehnfache an (Yeo et al. 2002).

1.2. Die Pankreaskarzinogenese, ein Tumorprogressionsmodell

In Anlehnung an das Progressionsmodell für kolorektale Neoplasien von Kinzler und Vogelstein (1996), das in zeitlicher Abfolge eine Adenom- Karzinom- Sequenz beschreibt, wurde von Hruban et al. ein Progressionsmodell der Karzinogenese des Pankreas entworfen (Hruban et al. 2000, siehe Abbildung 1). Normales duktales Pankreasepithel durchläuft hiernach bis zur Entwicklung eines invasiven Karzinoms verschiedene Stadien intraepithelialer Neoplasien, so genannte PanIN- Läsionen, „pancreatic intraepithelial neoplasias“. Die intraepithelialen Neoplasien werden nach histologischen Kriterien in drei Stadien unterteilt, wobei sich Stadium 1 nochmals in Stadium 1A und 1B differenzieren lässt. Im Zusammenhang mit morphologischen Veränderungen im Rahmen des PanIN- Modells stehen eine Reihe genetischer Alterationen, wie der Aktivierung von Onkogenen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die alle auch in invasiven Tumoren identifizierbar sind. In Korrelation mit dem Ausmaß der morphologischen Veränderungen lassen sich Akkumulationen verschiedener genetischer Mutationen beobachten.

Ein sehr frühzeitiges Ereignis in der Progression zum Pankreaskarzinom stellt die Veränderung des Proto- Onkogens K (Kirsten)- Ras dar (Hruban et al. 2000). Hierbei handelt es sich um eine Punktmutation, die in Kodon 12, seltener in Kodon 13 und 16, lokalisiert liegt (Bos 1989; Yeo et al. 2002). In der Mehrzahl der Mutationen erfolgt ein Basenaustausch von GGT zu GAT oder GTT, was ein Aminosäurewechsel von Glycin zu Asparagin oder Valin zur Folge hat (Pellegata et al. 1994). Diese Mutation bringt einen Verlust der intrinsischen GTPase- Aktivität und damit eine Akkumulation von konstitutiv- aktivem Ras mit sich, was auch durch das Vorhandensein von externen GAP- Molekülen („GTPase activating proteins“) nicht kompensiert werden kann (Bos 1989; Trahey und McCormick 1987).

Konstitutiv- aktives K- Ras lässt sich bereits in 45 % aller PanIN- Läsionen des Stadium 1 beobachten (Hruban et al. 2000). Seine Überexpressionsrate steigt im Verlauf der Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms, so dass letztendlich in 90 % bis 100 % aller invasiven Adenokarzinome des Pankreas onkogenes K- Ras vorliegt (Bos 1989; Moskaluk et al. 1997).

Als ein weiteres frühzeitiges genetisches Ereignis wird die Überexpression des HER-2/ neu- Rezeptors beschrieben (Hruban et al. 2000).

Im weiteren Verlauf der Tumorprogression kann mit steigender Häufigkeit eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16 nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt mittelgradiger und hochgradiger Dysplasien treten Mutationen im p53-, DPC4/SMAD4- und gelegentlich im BRCA- 2- Gen auf (Hruban et al. 2000). Eine weitere Fehlregulation zu diesem Zeitpunkt betrifft den Transkriptionsfaktor c- myc, der in der Entwicklung humaner Karzinome das am häufigsten vorkommende Onkogen darstellt (Cole und McMahon 1999). Eine Überexpression von c-myc wird mit ca. 70 % angegeben. Allerdings beruhen nur ca. 30 % hiervon auf genetischen Veränderungen.

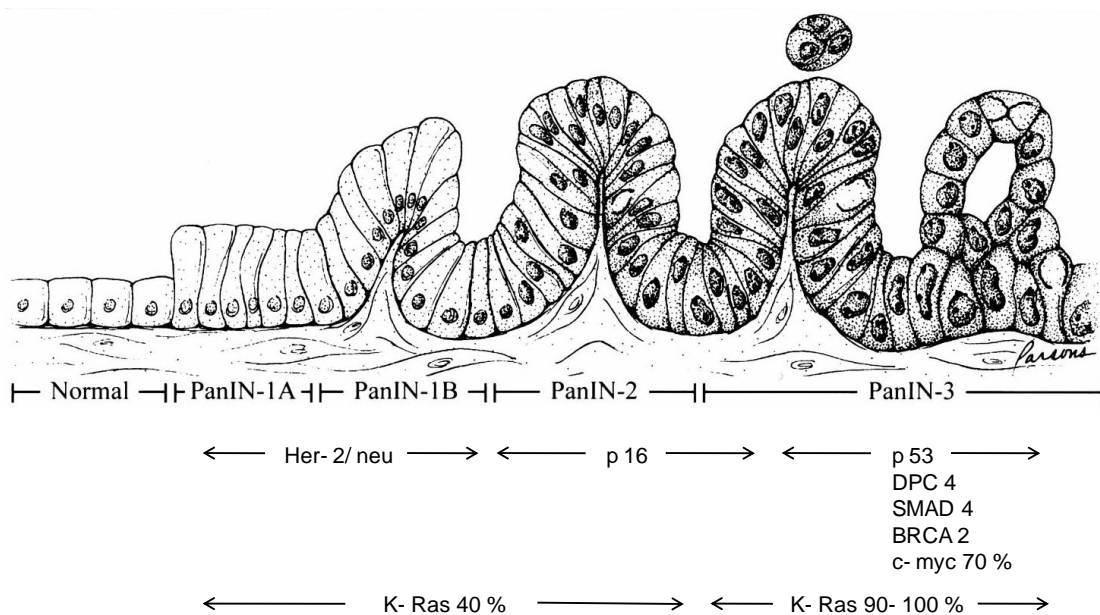


Abb. 1: Pankreasprogressionsmodell (Hruban et al. 2000)

1.3. Mitogene Kaskaden in der Pankreaskarzinogenese

1.3.1. Ras- abhängige mitogene Kaskaden

Wie bereits beschrieben, liegt Ras in 30 % aller malignen Tumoren in mutierter onkogener Form vor. Speziell im Pankreas lässt sich konstitutiv aktives K- Ras schon in frühen Vorläuferstadien (PanIN- Stadien) und letztendlich in 90 % bis 100 % aller invasiven Adenokarzinome finden (Roux und Blenis 2004; Bos 1989; Moskaluk et al. 1997).

Funktionell spielt Ras vor allem in der Regulation des Zellzyklus (G1-/ S- Phasen-Progression), der Proliferation, der Zelldifferenzierung und des –überlebens eine entscheidende Rolle (Meloche und Pouyssegur 2007; Massagué 2004). Zur Bewerkstelligung dieser verschiedenen Funktionen bedient sich Ras unterschiedlichen komplex nachgeschalteten Signalkaskaden (Janssen 2003; Shields et al 2000). Im Weiteren sollen jedoch nur jene Signalwege genauer betrachtet werden, die maßgeblich im Zusammenhang mit der Funktion des Zellwachstums stehen und sich damit im essentiellen Kontext zu dieser Arbeit befinden.

Von Bedeutung sind an dieser Stelle vor allem die PI3- Kinase (Phosphatidylinositol- 3- Kinase) mit ihren nachfolgenden Kinasen, sowie der Ras- Raf- MEK- ERK- Signalweg. Die Lipidkinase Phosphatidylinositol- 3 reguliert Zellwachstum vor allem über Regulation von Apoptose und Zellüberleben. Dabei induziert PI3K die Einleitung der Hydrolyse von Phosphatidylinositol (4, 5)- biphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol (3, 4, 5)- triphosphat (PIP₃), wodurch die Serin/ Threonin- Kinase Akt aktiviert wird (Massagué 2004). Durch Stimulation von Akt kommt es zu Prozessen, die das Apoptoseverhalten von Zellen unterdrücken (Janssen 2003).

Die Ras- Raf- MEK- ERK- Kaskade kontrolliert das Zellwachstum weniger über eine Hemmung der Apoptose, sondern vielmehr über eine Beschleunigung des Zellzyklus. Dabei bewirkt dieser Signalweg eine Induktion von Cyclin D1 und Inhibition von Tumorsuppressoren, wodurch Transduktionsprozesse aus der G1- in die S- Phase des Zellzyklus forciert werden (Massagué 2004; Murphy et al. 2003; Meloche und Pouyssegur 2007). Im Rahmen einer Mutation innerhalb der Ras-/ ERK- Kaskade kommt es dem zu Folge zu einem verstärktem Übertritt in die Synthesephase des Zellzyklus, was eine mangelnde Qualitätskontrolle des Erbguts durch fehlende Zellzyklusarretierungen an speziellen „Checkpoint- Kontroll- Stellen“ mit sich bringt. Diese ungenügende Kontrolle steht ganz im Zeichen onkogener Prozesse und ist für ihre Unterhaltung essentiell (Murphy und Blenis 2006).

Da diese Kaskade im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Interesse sein wird, soll an dieser Stelle etwas genauer hierauf eingegangen werden.

1.3.1.1. Die Ras- Raf- MEK- ERK- Kaskade

Der Signalweg der „extrazellulär Signal- regulierten Kinasen 1/2“ (ERK 1/2) wird durch Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinaktivität (typischerweise Wachstumsfaktor-Rezeptoren), G- Protein- gekoppelten- Rezeptoren oder Integrinen eingeleitet (Pouysségur et al. 2002). Als Rezeptorsubstrate dienen vor allem Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine (Roux und Blenis 2004; Murphy und Blenis 2006), welche über aktiviertes Ras Einfluss auf die Kinase- Kaskade ausüben.

Im Falle einer Kaskadenaktivierung über transmembrane Rezeptor- Tyrosinkinasen via Ras- Aktivierung, kommt es nach Wachstumsfaktorbindung zu einer Rezeptor- Dimerisierung. Der Wachstumsfaktor EGF (epidermal growth factor) gehört hierbei zu einem der am besten untersuchten seiner Art. Die Dimerisierung ermöglicht eine Autophosphorylierung von intrazellulär gelegenen Tyrosinresten des Rezeptors, die als Bindungsstelle für SH2- Gruppen von Adapterproteinen dienen. Sinn der Adaptermoleküle (u.a. Grb2, Shc) ist es, so genannte „guanine nucleotide exchange factors“ (GEF), wie das Ras- GEF „SOS“ (son of sevenless), zu aktivieren und zur Plasmamembran zu rekrutieren. SOS ist es dann möglich eine forcierte Phosphorylierung von Ras- gebundenem GDP zu GTP zu bewerkstelligen. GTP- Ras stellt die aktive Form des kleinen monomeren G- Protein dar und ist in dieser Konformation in der Lage, Raf als nachfolgendes Molekül der Kaskade zu beeinflussen (Roux und Blenis 2004; Seger und Krebs 1995; Porter und Vaillancourt 1998).

Im weiteren Verlauf der Kaskade kann durch aktiviertes Raf die MEK- Kinase an zwei Serin- Resten dual phosphoryliert werden, um dann ERK an je einem Tyrosin- und einem Threonin- Rest in der Zielsequenz TEY zu phosphorylieren (Pouysségur et al. 2002). Aktiviertem phosphoryliertem ERK ist es daraufhin möglich in den Zellkern zu translozieren und hier, ebenso wie im Zytoplasma, als Kinase zu wirken. Die Mehrheit der ERK- Substrate bilden Transkriptionsfaktoren, Membranproteine (u.a. CD120a, Syk, Calixin) und Proteine des Zytoskeletts (u.a. Neurofilamente, Paxillin). In der Literatur als erster beschriebener ERK- regulierter Transkriptionsfaktor gilt c- jun (Seger und Krebs 1995). Heute sind mehr als 160 Zielstrukturen von ERK bekannt (McCubrey et al. 2007). Zu den wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die durch ERK in ihrer Aktivität bzw. ihrer Induktion gesteigert werden, zählen Elk-1 (und andere Mitglieder der onkogenen Ets- Familie), CREB, STAT3, MEF2, p53, AP- 1 (c- jun und

c- fos), c- myc und Egr- 1 (Roux und Blenis 2004; Murphy und Blenis 2003, 2006; Roberts und Der 2007; McCubrey et al. 2007).

An dieser Stelle sei zu erwähnen, dass Signalamplifikationen innerhalb dieser Kaskade dazu führen, dass lediglich eine Aktivierung von 5 % aller vorhandenen Ras- Moleküle notwendig ist, um einen maximalen Effekt auf die ERK- Aktivierung auszuüben (Hallberg et al. 1994; Pouyssegur et al. 2002).

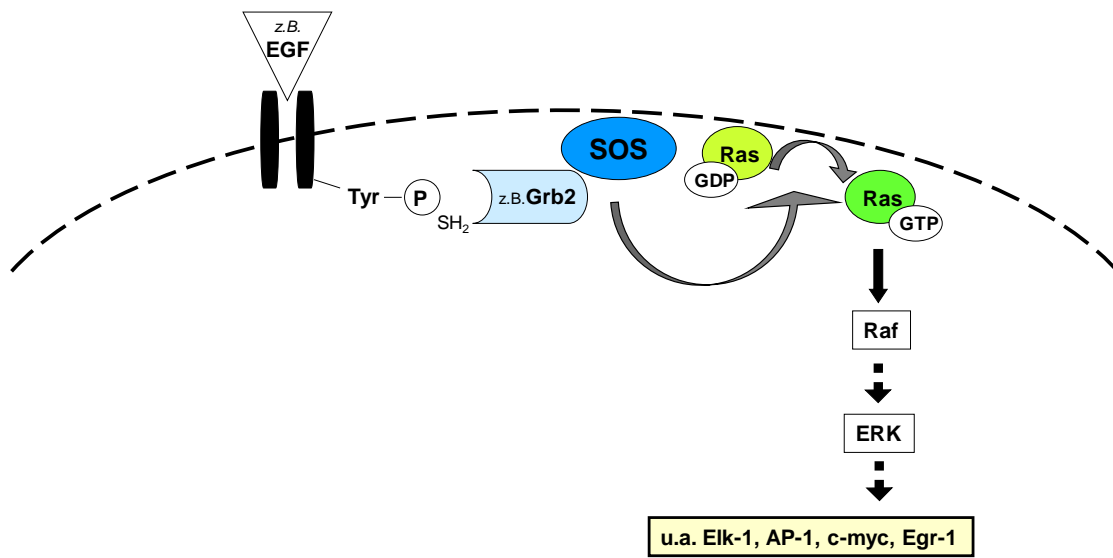


Abb. 2: Schematische Darstellung der MAP- Kinasen Aktivierungskaskade über Rezeptor-Tyrosinkinasen

1.3.2. Ras- unabhängige mitogene Kaskaden

1.3.2.1. Die Calcium-/ Calcineurin- Kaskade

Neben Ras- abhängigen Signalkaskaden mit mitogener Wirkung existiert auch noch eine Anzahl von Ras- unabhängigen Signalwegen, die das zelluläre Wachstum beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit soll im Folgenden vor allem die Calcium-vermittelte Aktivierung der Phosphatase Calcineurin besprochen werden (Baksh et al. 2000; Lipskaia und Lompré 2004).

Nach Rezeptorstimulation durch Bindung eines extrazellulären Aktivators, beispielsweise EGF, wird aus dem heterotrimeren rezeptorgekoppelten G_q - Protein die α_q - Untereinheit freigesetzt. Diese bindet an die Phospholipase C (PLC) und bewirkt

somit ihre Aktivierung. Im aktivierten Zustand ist die Phospholipase C in der Lage die hydrolytische Spaltung des Membranlipids Phosphatidylinositol (4, 5)- bisposphat (PIP_2) in die Second- Messenger Diacylglycerol (DAG) und Inositol (1, 4, 5)- trisphosphat (IP_3) zu katalysieren (Hogan et al. 2003; Freske et al. 2003).

Im Weiteren wird durch die Freisetzung des hydrophilen IP_3 eine Erhöhung der freien intrazellulären Calciumkonzentration erreicht, indem es an Calcium- Kanäle des Endoplasmatischen Retikulums bindet und diese dadurch öffnet. Der folgende Calcium- Influx ins Zytosol erlaubt eine Calcium- abhängige Aktivierung von Calmodulin (CaM), was seinerseits eine Stimulation der Calmodulin- abhängigen Phosphatase Calcineurin erlaubt. Calcineurin ist daraufhin in der Lage Proteine unterschiedlichster Gruppen, unter anderem Transkriptionsfaktoren, zu aktivieren (Lee und Park 2006; Macian 2005). Parallel hierzu agiert das hydrophobe DAG an der Zellmembran und aktiviert unter anderem eine Proteinkinase C. Neben vielen anderen Effekten dieser Kinase ist an dieser Stelle aufgrund der vorliegenden Thematik auf eine durch sie erlaubte Verbindung der beschriebenen Calcium/ Calcineurin- Kaskade mit dem zuvor aufgeführten Ras-/ ERK- Signalweg hinzuweisen, die durch eine direkte Phosphorylierung von Raf mittels Proteinkinase C ermöglicht wird (Segger und Krebs 1995).

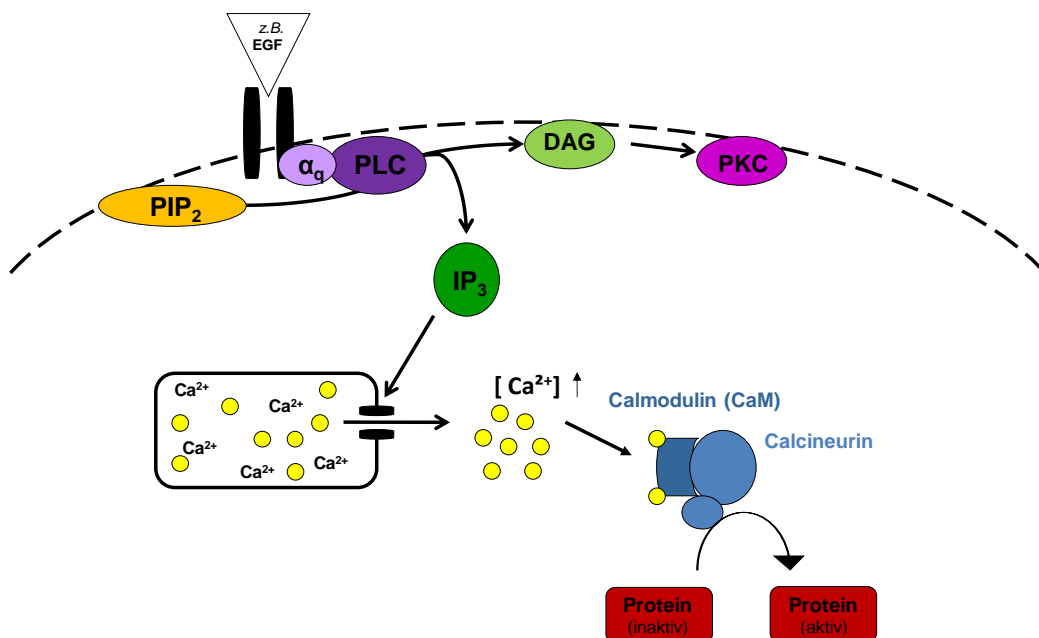


Abb. 3: Schematische Darstellung der Calcium-/ Calcineurin- Kaskade über Rezeptor-Tyrosinkinasen

1.4. Mitogene Transkriptionsfaktoren- die Gruppe der „Immediate early“- Gene

Zu der Gruppe der „Immediate early“- Gene (IEG) werden Gene bzw. ihre Produkte gezählt, die per Definition in ihrer Induktion keine Proteinneusynthese voraussetzen und somit in unmittelbarer Reaktion auf einen Stimulus innerhalb weniger Minuten transkriptionell induziert werden (Fambrough et al. 1999; Murphy et al. 2003). Dabei handelt es sich teilweise um Transkriptionsfaktoren, die selbst in vielen Signalkaskaden als „third messenger“ zwischen Zelloberflächenrezeptoren, zytoplasmatischen „seconde messenger“- Molekülen und spezifischen Zielgenen der Kaskade fungieren (Kiessling und Gass 1993).

Diese zuerst in Retroviren entdeckte Gruppe an Genen, die unmittelbar nach Invasion einer Wirtszelle transkribiert werden, konnten schlussendlich auch für das humane Genom festgestellt werden (Simon et al. 2006). Murphy und Blenis konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass die funktionelle Relevanz der „Immediate early“- Gene neben der Zellspezifität auch davon abhängig ist, wie lange sich ihr Induktionszeitraum erstreckt. Ein anhaltender Induktionsstimulus bewirkt eine Beteiligung von IEG-Transkriptionsfaktoren in der Zellzyklusregulation, im Zellwachstum und in der Differenzierung (Murphy et al. 2002; Murphy und Blenis 2006). Genauere Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe konnten darlegen, dass IEG- Proteine im Hinblick auf ihren Einfluss auf den Zellzyklus zur Zeit des Überganges von der G1- in S- Phase vermehrt exprimiert werden (Murphy et al. 2003; Murphy et al. 2002). In diesem Zusammenhang konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Überexpression von einigen IEG- Proteinen, wie c- fos, c- jun, c- myc, als Zeichen maligner Transformationen gelten (Murphy und Blenis 2006).

Zu den prominentesten Vertretern der Gruppe der „Immediate early“- Gene zählen die Transkriptionsfaktoren c- fos und c- jun (gemeinsam als AP-1- Molekül deklariert), c- myc und Egr- 1. Proteine, die als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden, sind all jene, die für Prozesse der Transkription im Nukleus der Zellen verantwortlich sind und somit die Expression von Genen kontrollieren. Transkriptionsfaktoren sind maßgeblich an der Bildung sog. Initiationskomplexe beteiligt, durch die es der RNA- Polymerase II ermöglicht wird, ihre Bindung mit der Promotorsequenz des entsprechenden Gens einzugehen und die Synthese der komplementären mRNA- Matrize zu beginnen (Hochheimer und Tijan 2003). Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren im Zellkern, das Vorhandensein von Partnerproteinen, die räumliche Organisation der Zielgene und

die Exposition von spezifischen DNA-Konsensussequenzen beeinflussen die funktionellen Effekte von Transkriptionsfaktoren auf die Zelle.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die wichtigsten „Immediate early“-Transkriptionsfaktoren gegeben werden.

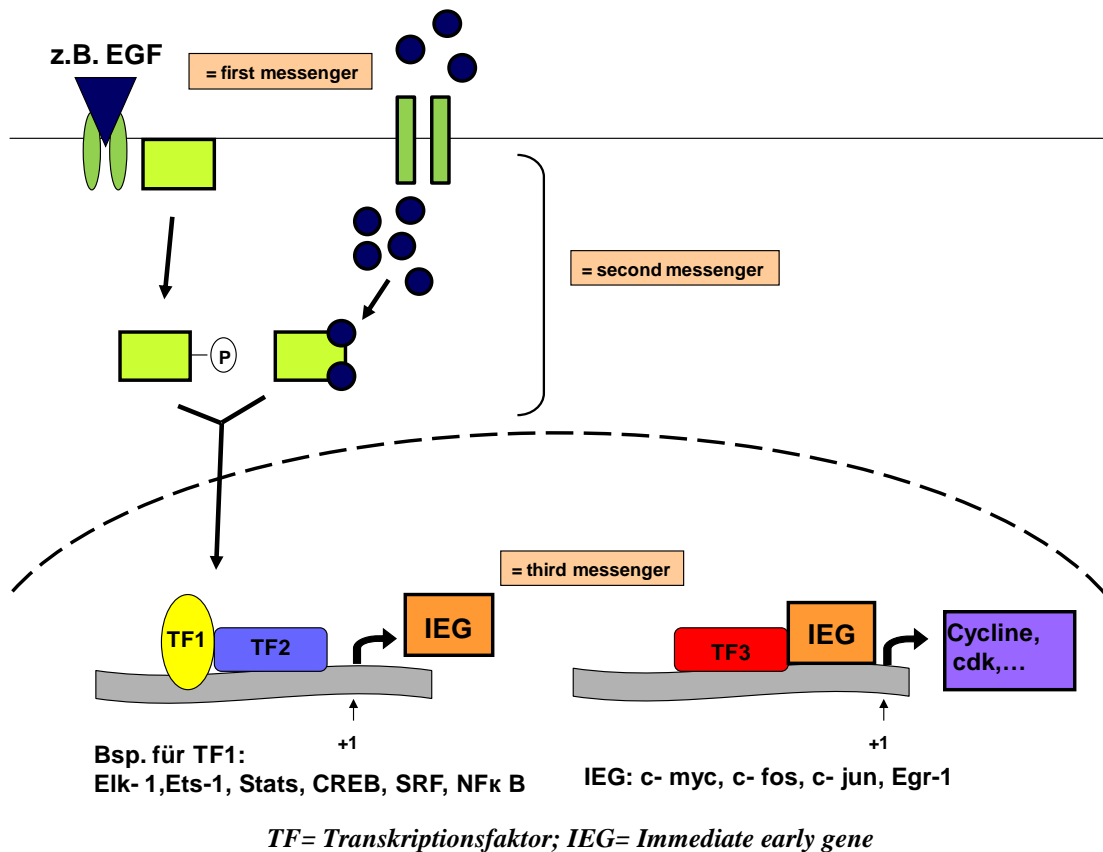


Abb.4: Schematische Darstellung der third messenger- Gruppe der „Immediate early“- Gene als Vermittler zwischen cytoplasmatischen Kaskaden und ihren Zielgenen

1.4.1. Der Transkriptionsfaktor c- myc

C- myc ist ein mitogener Transkriptionsfaktor, der die Charakteristika eines Proto-Onkogens aufweist. Die Gen- Familie myc umfasst aktuell fünf Mitglieder. Zu ihr gehört neben c- myc auch L- myc, N- myc, S- myc und B- myc (Cornwall et al. 2001). Durch Überexpression oder Genamplifikation spielt c- myc in den verschiedensten Neoplasien eine Rolle und ist derzeit die am häufigsten gefundene Mutation in humanen Karzinomen (Cole und McMahon 1999; Schleger et al. 2002).

Mit seiner C- terminal lokalisierten "basischen Helix- Loop- Helix- Leucin- Zipper"- Domäne (bHLH- Zip) ist c- myc befähigt, Transkriptionsprozesse zu modifizieren. Hierfür bindet myc mit seiner basischen Domäne an sequenzspezifische DNA- Regionen der Konsensussequenz 5'- CACGTG- 3' der entsprechenden Gene (Enhancer- Boxen, E- Boxen) (Prendergast und Ziff 1991; Dang 1999). Das C- terminal abschließende „Helix- Loop- Helix“-, sowie das „Leucin- Zipper- Motiv“ stellen Dimerisierungsdomänen von myc dar, wodurch die obligatorische Bindung zu seinem Partnerprotein max gewährleistet wird (Blackwood und Eisenman 1991; Massagué 2004; Molche und Pouyssegur 2007). Der Heterodimerisierungspartner max gehört ebenfalls zur Familie der bHLH- Zip- Proteine und stellt in vielen Fällen die Voraussetzung für die Erkennung und Bindung von myc an die DNA dar (Blackwood und Eisenman 1991). N- terminal der soeben beschriebenen DNA- Bindungs- und Dimerisierungsdomänen befinden sich die zentrale- und die aminoternale Region der Primärstruktur von c- myc. Sie erfassen die hochkonservierenden Regionen der sogenannten „Myc- Boxen“, die Transaktivierungsdomäne, als auch die Zellkernlokalisationssequenz (NLS, nuclear localisation signal). Die verschiedenen „Myc- Boxen“ dienen als Bindestellen für Interaktionspartner und werden als essentiell für die Gewährleistung der biologischen Funktionen von c- myc angesehen (Dang 1999). C- myc besitzt eine große Anzahl an Zielgenen, was seinem breiten funktionellen Spektrum entspricht. Im Konsens dieser Arbeit soll an dieser Stelle vor allem auf die Relevanz von c- myc auf zellzyklus- und wachstuminduzierende Effekte eingegangen werden.

Während in ruhenden Zellen der G0- Phase c- myc kaum exprimiert wird, erhöht sich die mRNA- und Proteinsynthese von c- myc als Antwort auf eine Stimulation mit mitogenen Faktoren oder Serum (Facchini und Penn 1998; Waters et al. 1991). Infolge seiner Aktivierung übt c- myc sowohl über direkt aktivierende Effekte, als auch über indirekt wirkende Mechanismen, einen fördernden Einfluss auf die Progression des Zellzyklus aus. Die am besten untersuchte DNA- Zielstruktur von c- myc im Zusammenhang mit direkten Stimulationseffekten auf Zellzyklusgene sind die Gen- Promotoren von Cyclin D2 (Bouchard et al. 1999; Coller et al. 2002), Cyclin E, cdk 2 (Amati et al. 1998) und cdk 4 (Hermecking et al. 2002). Durch Begünstigung der Cyclin-/ cdk- Komplexbildung zwischen Cyclin D2 und cdk 4 wird die Aktivierung des Komplexes Cyclin E/ cdk 2 ausgelöst. C- myc forciert somit die Beendigung der G1- Phase und beschleunigt den Übergang in die S- Phase des Zellzyklus (Amati et al.

1998; Claasesen und Hann 2000). Ein weiteres Cyclin, das durch den Einfluss von c-myc reguliert wird stellt Cyclin D1 dar (Chambard et al. 2006). Indirekt wirkt sich c-myc unterstützend auf die Tumorprogression aus, indem es Tumorsuppressions- Gene, wie p15, p21 und p27, inhibiert (Claasesen und Hann 2000; Massagué 2004; Bouchard et al. 1999; Yang et al. 2001; Staller et al. 2001). Anzumerken sei an dieser Stelle, dass die c- myc- Expression und seine damit einhergehenden, soeben beschriebenen Effekte vor allem in noch nicht ausdifferenzierten oder onkogen veränderten Zellsystemen eine Rolle spielt (Facchini und Penn 1998).

1.4.2. Der Transkriptionsfaktor Egr- 1

Die Familie der Egr- Gene („early- growth- response“- Gene) umfasst im Wesentlichen vier Mitglieder, die mit den Nummern eins bis vier deklariert sind (Cao et al. 1990; Sukhatme 1991; Sells et al. 1995). Sie alle kodieren für Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, die drei homologe Zinkfinger- Domänen der Subgruppe Cys2His2 beinhalten. Genauer formuliert bedeutet dies, dass innerhalb dieser Sequenz Aminosäurereste der Gruppen Cystein und Histamin eine nicht- kovalente Bindung zu einem Zink- (II)- Ionen eingehen (Cao et al. 1990; Sukhatme 1990). Durch Einfügung der Zinkfinger- Sequenzen in die großen Furchen der zu replizierenden DNA modifizieren Egr- Transkriptionsfaktoren unter Bindung an Guanin- Cytosin- reiche Sequenzen die Expression verschiedenster Gene (Gashler und Sukhatme 1995). So können unter anderem DNA- Bindungssequenzen für Egr- 1 an zellzyklusregulierenden Genen, wie Cyclin D1, Cyclin D2 (Virolle et al. 2003) und p21 (Ragione et al. 2003) erfasst werden. Als funktionelle Konsequenzen auf das Wachstums- und Proliferationsverhalten maligner Zellen werden in den verschiedenen Zelltypen sowohl förderliche (Scharnhorst et al. 2000; Virolle et al. 2003) als auch hemmende Wirkungen (Huang et al. 1997; Calogero et al. 2001) von Egr- 1 beschrieben.

1.4.3. Die Transkriptionsfaktoren c- jun und c- fos

Die "Immediate early"- Gene c- jun und c- fos werden in der Literatur häufig als das Heterodimer AP- 1, "activator protein- 1", beschrieben. Die Fusion zu dieser dimeren Einheit organisiert sich über exponierte leucinreiche Aminosäurendomänen, sogenannte „basische Leucin- Zipper- Regionen (bLZip)“, die beide Proteine aufweisen (Gentz et al. 1989). Möglich sind auch homogene Verbindungen zwischen jun/ jun oder fos/ fos, die ebenfalls, wie auch Fusionsprodukte mit anderen Proteinen der „Leucin- Zipper“- Familie („jun dimerization partners“, JDP, „activating transcription factors“, ATF, „musculoaponeurotic fibrosarcoma“- Protein, Maf- Protein), als AP-1- Proteine bezeichnet werden. Über die basische Sequenz des „Leucin- Zipper“- Motivs binden die AP-1- Proteine an die DNA. Funktionell beeinflussen sie so unter anderem das Wachstums-, Proliferations-, Apoptose- und Überlebensverhalten von Zellen (Karin et al. 1997; Shaulian und Karin 2001). Ihre Rolle als Protoonkogene sichert ihnen ihren fördernden Einfluss auf neoplastische Ereignisse (Murphy und Blenis 2006). Molekularbiologisch regulieren sie ihre Funktionen auf zwei Ebenen. Zum einen steigern sie die Expressionsrate des zellzyklusvorantreibenden Cyclin D1- Gens, das im Komplex mit cdk 4 essentiell für die Transition der G1- in die S- Phase des Zellzyklus steht. Zum anderen besitzt der heterodimere jun-/ fos- Komplex die Fähigkeit über suppressive Eigenschaften den Zellzyklus progressiv zu beeinflussen, wozu die Tumorsuppressorgene p53, p21^{cip1/waf1} und p16 gehören (Shaulian und Karin 2001). Stimuliert wird die AP- 1 Protein- Synthese und -Aktivität durch diverse Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, inflammatorische Zytokine und kurzwelliges UV- Licht, und einem komplexen Netzwerk von Signalwegen. Die weitaus bekannteste Signalkaskade, die in der Literatur in diesem Zusammenhang propagiert wird, ist neben dem Einfluss durch die Proteinkinase C, der Ras-/ ERK- Signalweg (Hogan et al. 2003; Zhou et al. 2002), wobei c- jun als eines der als erstes beschriebenen Substrate von ERK gilt (Seger und Krebs 1995).

1.5. Ziel dieser Arbeit

Wie bereits ausgeführt, stellt das Adenokarzinom des Pankreas eine der aggressivsten malignen Erkrankungen des Menschen dar, was vor allem durch ein extrem schnelles Wachstum, unterhalten durch die Aktivierung onkogener Signalkaskaden, begründet wird (Rosewicz und Wiedenmann 1997; Yeo et al. 2002).

Basierend auf einem Tumorprogressionsmodell nach Hruban et al. lassen sich schon innerhalb von Vorläuferstadien des Pankreaskarzinoms, in sogenannten PanIN- Stadien, verschiedene genetische Alterationen beobachten, die sich im Verlauf akkumulieren. Eine der frühesten molekulargenetischen Schlüsselereignisse in der Tumorentstehung bildet die Punktmutation der GTPase K- Ras. Funktionell spielt Ras eine entscheidende Rolle in der Regulation von Zellzyklus- Genen zur Transition der G1- in die S- Phase (Meloche und Pouyssegur 2007; Massagué 2004). Ebenso lässt sich frühzeitig eine Überexpression des Transkriptionsfaktors c- myc zum Zeitpunkt nicht invasiver Neoplasien beobachten, wovon sich jedoch nur 30 % auf genetische Veränderungen zurückführen lassen.

Neben Ras- abhängigen Signalwegen werden in der Literatur auch Ras- unabhängige Signalwege mit mitogenen Eigenschaften beschrieben, die mit der Funktion der Wachstumsstimulation assoziiert sind. Eine dieser Kaskaden stellt die Calcineurin-Kaskade dar, die im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden soll (Baksh et al. 2000; Lipskaia und Lompré 2004).

Als übergeordnetes Ziel dieser Arbeit soll somit versucht werden, ein detaillierteres Verständnis über das aggressive Wachstumsverhalten des Pankreaskarzinoms zu erlangen. Hierfür werden die zuvor beschriebenen und aus der Literatur in diesem Zusammenhang bekannten Kaskaden herangezogen und ihre Auswirkung auf transkriptionelle Ereignisse der Zellzykluskontrolle geprüft. Im Fokus sollen hierbei die mitogenen Transkriptionsfaktoren der Familie der „Immediate early“- Gene stehen, deren Induktion ein frühes Ereignis in der Zellzyklusinduktion darstellt und die speziell im Zusammenhang mit malignen Transformationsprozessen gesehen werden. Ihre Regulation und Relevanz für das maligne Wachstumsverhalten des Pankreaskarzinoms soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer beleuchtet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in folgender Tabelle (Tabelle 1) mit ihren Eigenschaften, ihrem Kultivierungsmedium und ihrer Herkunft aufgeführt.

Zelllinie	Beschreibung/ Eigenschaften	Kulturmedium	Herkunft
8988t	Humane Pankreaskarzinomzelllinie, adhärent wachsend	DMEM	H.P. Elsässer, Institut für Zyto-biologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg, Deutschland
Panc- 1	Humane Pankreaskarzinomzelllinie, adhärent wachsend	DMEM	European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Großbritannien
IMIM- PC 1	Humane Pankreaskarzinomzelllinie adhärent wachsend	DMEM	F.X. Real, Institute Municipale de Investigacion Medica, Barcelona, Spanien

***Tabelle 1: Beschreibung/ Eigenschaften, Kulturmedium und Herkunft der in dieser Arbeit
verwendeten Zelllinien***

Die Kultivierung der verschiedenen adhärent wachsenden Zelllinien erfolgt in Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 0,2 % Normocin. Die Inkubation der Zellen erfolgt in einem 37 °C warmen Brutschrank, in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Das Kulturmedium wird alle drei bis vier Tage gewechselt und die Zellen abhängig vom Wachstumsverhalten bei genügend hoher Zelldichte passagiert. Hierzu wird unter sterilen Bedingungen unter einer Bench das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen und anschließend mit ca. 3- 6 ml (je nach Kulturflaschengröße) einer sterilen Trypsin- EDTA- Lösung für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert, so dass sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche lösen. Die gelösten Zellen werden in ein Falcon- Röhrchen mit mindestens der doppelten Menge

an Medium aufgenommen und bei 1200 rpm 3 Minuten (Raumtemperatur) zentrifugiert. Der entstandene Medium- Trypsin- Überstand wird abgesaugt und das Zellpelett in Kulturmedium resuspendiert. Folglich können die vereinzelteten Zellen in einer dem Wachstumscharakter der Zelllinie entsprechenden Verdünnung (in der Regel 1:3 bis 1:10) in eine neue Kulturflasche überführt oder zur Weiterverarbeitung genutzt werden.

Reagenzien:

- | | | |
|---|---------------------------|-------------------------|
| - | DMEM-Medium | (PAA Laboratories GmbH) |
| - | FCS (fötales Kälberserum) | (PAN Biotech GmbH) |
| - | Normocin | (Amaxa biosystems) |
| - | DPBS | (PAA Laboratories GmbH) |
| - | Trypsin-EDTA | (PAA Laboratories GmbH) |

Materialien:

- | | | |
|---|---|--|
| - | Gewebekulturflaschen 650 ml, mit Filter | (Greiner bio- one, Frickenhausen) |
| - | Gewebekulturflaschen 250 ml mit Filter | (Greiner bio- one, Frickenhausen) |
| - | Petrischalen 60 mm | (Greiner bio- one, Frickenhausen) |
| - | Petrischalen 100 mm | (Greiner bio- one, Frickenhausen) |
| - | 24- well Kulturplatten | (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark) |
| - | 12- well Kulturplatten | (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark) |
| - | 6- well Kulturplatten | (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark) |
| - | Eppendorf Reaktionsgefäße | (Eppendorf, Hamburg) |
| - | Zellschaber | (Greiner bio- one, Frickenhausen) |
| - | Bench, Lamin Air HB 2448 | (Heraeus Instruments, Langenselbold) |
| - | Brutschrank | (Heraeus Instruments, Langenselbold) |

2.2. Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Die abgelösten, pelettierten, resuspendierten und vereinzelteten Zellen (wie oben beschrieben) werden vor ihrer Weiterverarbeitung mittels Neubauer- Zählkammer in ihrer Zellzahl bestimmt. Hierfür werden ca. 10 µl der Zellsuspension in den

Kapillarspalt der Neubauer- Zählkammer pipettiert, so dass die vier Quadrate des Kammerbodens bedeckt sind. Unter dem Mikroskop wird die Zellanzahl in jedem der vier Quadrate ermittelt. Die Ergebnisse werden im Anschluss gemittelt und mit 10.000 multipliziert, um auf die Zellanzahl eines Milliliters zu gelangen. Mittels Dreisatzrechenverfahren kann daraufhin das Suspensionsvolumen für die gewünschte Zellanzahl ermittelt werden.

Als Richtwerte können für die verwendeten Zelllinien folgende Zellzahlen angenommen werden um nach 12 bis 24 Stunden eine Zellkonfluenz von 60- 80 % zu erreichen (leichte Abweichungen zwischen den einzelnen Zelllinien durch unterschiedliches Wachstumsverhalten):

6- Well- Platten:	180.000 Zellen
12- Well- Platten:	79.000 Zellen
24- Well- Platten:	50.000 Zellen
100 mm ² - Schalen:	1.000.000 Zellen
60 mm ² - Schalen:	230.000 Zellen

2.3. Zelltransfektion

Unter Transfektion wird das Einbringen von RNA/ DNA in eukaryotische Zellen verstanden, wobei zwischen zwei verschiedenen Formen der Transfektion unterschieden werden kann, der „transienten Transfektion“ und der „stabilen Transfektion“.

Die „transiente Transfektion“, deren molekularbiologische Methode sich im Rahmen dieser Arbeit bedient wird, stellt eine vorübergehende Einbringung eines extrachromosomalen Plasmids in die Wirtszelle dar. Folglich erhält man eine zeitweilige Expression des kodierten Gens.

Um bestmögliche Transfektionseffizienzen zu erhalten, muss je nach Zelllinie und Plasmid zwischen unterschiedlichen Transfektionsreagenzien gewählt werden.

2.3.1. Transiente Transfektion von DNA

Am Vortag werden die Zellen abhängig von der Zelllinie und der Wellgröße in entsprechender Zellzahl ausgesät und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Als Transfektionsreagenz für Plasmid- DNA wird bei den hier verwendeten Zelllinien „Transfast“ (Promega, Mannheim) verwendet. Transfiziert wird in serumfreiem Kulturmedium ohne Antibiotikazusatz, um zelltoxische Effekte während des Vorgangs der Transfektion möglichst zu minimieren. Pro 1 µg DNA werden 3 µl „Transfast“-Reagenz eingesetzt und gemeinsam in Polystyrolröhrchen gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wird das DNA-/Transfektionsreagenzgemisch auf die Zellen gegeben. Zuvor wird den Zellen das Kulturmedium entfernt und die Zellen werden einmalig mit serumfreiem Medium ohne Antibiotikazusatz gewaschen. Nach einer Stunde Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C wird jedem Well dasselbe Volumen an serumhaltigem Medium hinzugefügt. Nach frühestens 24 Stunden können die transfizierten Zellen weiter verarbeitet werden.

DNA- Konstrukt	Vektor	Herkunft	Besonderheit
Humaner Interleukin-2-Promotor	5‘ cat gaa aca gtt ttt cct cct tag a- 3‘	Biopolymer, Ulm	Biotin- gekoppelt

Tabelle 2: Verwendete DNA- Vektoren

2.3.2. Transiente Transfektion von siRNA

RNA- Interferenz (RNAi) beschreibt die Expressionsunterdrückung einzelner Gene in eukaryonten Zellsystemen. Mittels synthetisch hergestellter siRNA- Molekülen (small-interferenz RNA), die aus doppelsträngiger RNA (dsRNA) und einer Länge zwischen 21 und 28 Nukleotiden (nt) bestehen, wird diese spezifische Hemmung auf posttranskriptioneller Ebene, durch Abbau der mRNA des Zielgens, bewerkstelligt. Seit ein paar Jahren zählt der Einsatz von siRNA zu den gängigen molekularbiologischen

Methoden der Gen- Suppression, durch welche die physiologische Relevanz einzelner Gene überprüft werden kann.

2.3.2.1. Transfektionsreagenz: siLentFect

Die adhärente sehr entdifferenzierte Zelllinie 8988t wird mit Hilfe des Transfektionsreagenz „siLentFect- Lipid Reagent“ (Bio- Rad, Hercules, USA) behandelt. Die zu transfizierenden Zellen liegen am Tag der Transfektion optimaler Weise in einer Konfluenz von 60- 80 % vor. Mindestens 15 Minuten vor Transfektionsbeginn wird den zu transfizierenden Zellen neues Medium zugeführt. Je Ansatz wird in 100 µl serumfreiem Kulturmedium ohne Antibiotikazusatz 7 µl siRNA bzw. negativ Kontroll- siRNA und in 100 µl serumfreien Kulturmedium ohne Antibiotikazusatz 7 µl „siLentFect“- Transfektionsreagenz gegeben. Die Transfektionslösungen werden in Polystyrolröhrchen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wird das RNA-/ Transfektionsreagenzgemisch in das Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden können die transfizierten Zellen weiter verarbeitet werden.

2.3.2.2. Transfektionsreagenz: TransMessenger

Die adhärente verhältnismäßig differenzierte Zelllinie Panc-1 wird mit Hilfe des Transfektionsreagenz „TransMessenger“ (Quiagen, Hilden) behandelt. Die zu transfizierenden Zellen liegen am Tag der Transfektion optimaler Weise in einer Konfluenz von 60- 80 % vor. In Polystyrolröhrchen wird pro Ansatz 89 µl ECR- Puffer, 4 µl Enhancer und 7 µl siRNA bzw. negativ Kontroll- siRNA zusammen pipettiert. Das Gemisch wird gevortext und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 8 µl der TransMessenger- Reagenz hinzugefügt. Nach Vortexen und einer weiteren Inkubation von zehn Minuten bei Raumtemperatur wird das Transfektionsgemisch mit 900 µl serumfreiem Kulturmedium ohne Antibiotikazusatz angereichert und auf die gewaschenen Zellen gegeben. Der Ansatz inkubiert für drei bis vier Stunden im Brutschrank bei 37 °C. Danach wird das RNA-/ Transfektionsgemisch entfernt und durch Kulturmedium ersetzt. Um eine erhöhte Transfektionseffizienz zu

erreichen, wird das Protokoll am folgenden Tag wiederholt. Die Zellen können nach weiteren 24 Stunden weiter verarbeitet werden.

siRNA- Konstrukt	Sequenz	Herkunft
Kontrolle	Silencer Negative Control #2 siRNA	Ambion, Austin, TX, USA
c- myc	5`-CGAGCUAAAACGGAGCUUUTT-3`	Ambion, Austin, TX, USA
EGR-1	5`-CGUCGGUGGCCACCACGUAdTdT-3`	Quiagen, Hilden
NFATc1	5`-CCUCGCCAAUAAUGUCACctt-3`	Ambion, Austin, TX, USA
NFATc2 #1	5`-GGUCAUUUUCGUGGAGAAATT-3`	Ambion, Austin, TX, USA
NFATc2 #2	5`-GAAACUCCGACAUGAACUTT-3`	Ambion, Austin, TX, USA

Tabelle 3: Verwendete siRNA- Konstrukte

2.4. Zellbehandlungen

2.4.1. Der indirekte ERK- Inhibitor U0126

Versuchsansätze, die eine Modifizierung der Ras- Raf- MEK- ERK- Kaskade beinhalten sollen, werden mit 0,5 µM des indirekten ERK- Inhibitors U0126 (1,4- diamino- 2,3- dicyano-1,4- bis(2- aminophenylthio) butadien) (Calbiochem) behandelt. U0126 wirkt unter allosterischer Bindung an MEK und hemmt somit spezifisch ERK in seiner Aktivität, da ERK das einzig bekannte Substrat von MEK darstellt (Roberts und Der 2007; McCubrey et al. 2006).

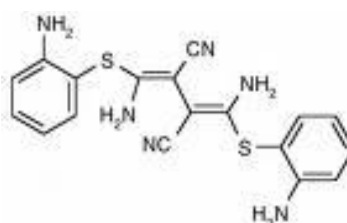


Abb. 5: Struktur des MEK1/2- Inhibitors U0126
(www.lclabs.com)

2.4.2. Der Calcineurin- Inhibitor Cyclosporin A (CsA)

Versuchsansätze, die eine Modifizierung der Calcium- abhängigen Phosphatase-Aktivität von Calcineurin enthalten sollen, werden mit 1 μM Cyclosporin A (CsA) behandelt.

Cyclosporin A bindet hierfür an niedermolekulare intrazelluläre Rezeptoren, so genannten Immunophiline (spezifisch in Lymphozyten ist dies für CsA Cyclophilin A). Folglich unterbindet das entstandene Heterodimer in direkter Interaktion mit der katalytischen Domäne von Calcineurin irreversibel die Aktivität dieser Serin/Threonin-Phosphatase (Serfling et al. 2000; Crabtree 1999). Seinen therapeutisch bedeutsamsten Stellenwert erlangt Cyclosporin A vorrangig als Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin.

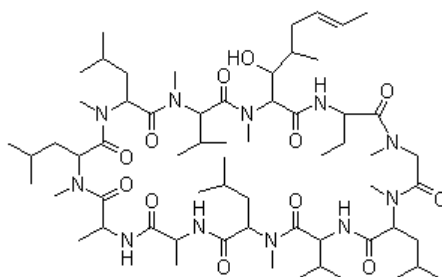


Abb. 6: Struktur des Calcineurin- Inhibitors Cyclosporin A
(www.chemblink.com)

2.5. Luziferase Reporter Gen Assay

Um Promotor- Aktivitäten quantitativ zu untersuchen bedient man sich der Methode des Luziferase Reporter Gen Assays. Hierfür werden die Zellen mit einem für die Photinus-pyralis- Luziferase („Firefly- Luziferase“) kodierenden Vektor transfiziert. Dem Luziferase- Gen vorgeschaltet, liegen die entsprechend zu untersuchenden Promotor-Sequenzen (Promotorplasmide). Ebenso werden in die Zellen Effektorplasmide transfiziert, deren Genprodukte in ihrer Interaktion mit der Promotor- Sequenz überprüft werden sollen.

Um für jeden der einzelnen Messwerte der „Firefly- Luziferase“ in der späteren Auswertung des Assays einen Referenzwert zu erhalten, wird jedem Ansatz zur Egalisierung ein Renilla- Luziferase- Konstrukt zugeführt.

Das Prinzip der indirekten Promotor- Aktivitätsmessung basiert auf einer Lichtemissionsmessung, die sich im Luminometer detektieren lässt. Durch Induktion der transfizierten Promotor- Sequenz kommt es zur Expression der nachgeschalteten „Firefly- Luziferase“, welche die ATP- abhängige oxidative Decarboxylierung von Luziferin zu Oxyluziferin, unter gleichzeitiger Lichtemission katalysiert. Die Lichtemission folgt hierbei proportional zur Luziferase- Aktivität. Dadurch stellt sie eine Größe der zu untersuchenden vorgeschalteten Promotor- Aktivität dar.

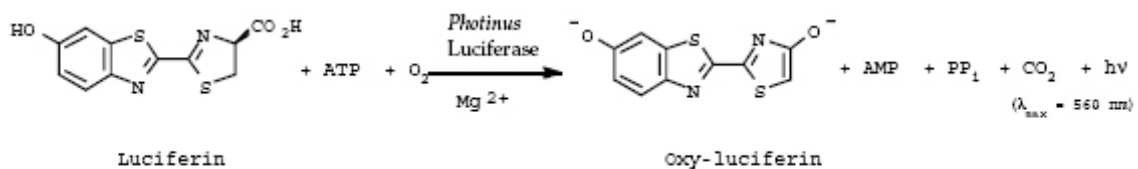


Abb. 7: Oxidative Decarboxylierungs- Reaktion von Luziferin zu Oxyluziferin
 (www.biocompare.com)

Nach ähnlichem Prinzip kann auch die Normalisierungs- Reaktion durch die Renilla- Luziferase beschrieben werden. Auch hierbei entsteht als Produkt der Renilla- Aktivität im Luminometer erfassbares Licht.

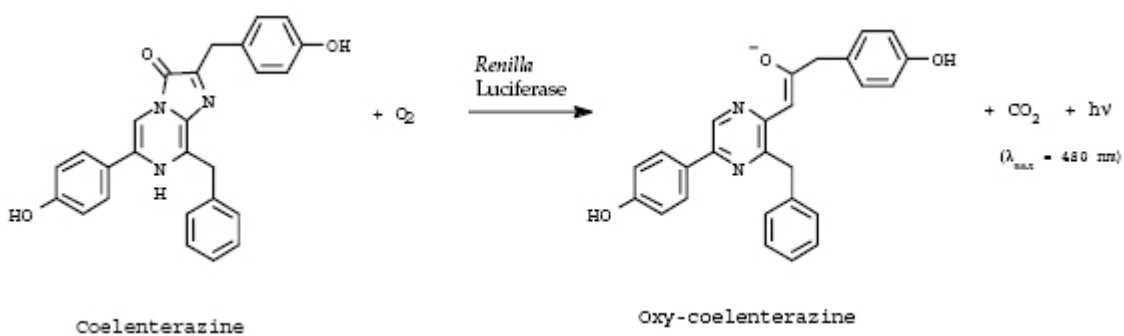


Abb. 8: Oxidations- Reaktion von Coelentrerazin zu Coelenteramid
 (www.biocompare.com)

Nachdem die Zellen, die am Vortag ausgesät wurden, eine Konfluenz von 60- 80 % erreicht haben, können die DNA- Plasmide der Wahl nach entsprechendem Protokoll (s.o.) transfiziert werden. Nach frühestens 24 Stunden können die Zellen weiter

verarbeitet werden. Hierfür werden sie einmalig mit gekühltem DPBS gewaschen und anschließend mit ca. 200 µl Passive- Lysepuffer (Promega, Mannheim) für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler lysiert. Die Ablösung der Zellen wird manuell mit einem Zellscraper unterstützt und die Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Trennung von Zelltrümmern und Zellproteinen wird die Zelllysatlösung für eine Minute bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.

Zur Versuchsauswertung der Promotorplasmid- Aktivität („Firefly- Luziferase“) werden 30 µl des Überstandes jeder Probe in eine 96- Well- Platte pipettiert und mit 30 µl eines Luziferase- Puffers (Promega, Mannheim) überschichtet. Die Induktion des Promotorkonstrukts wird dann im Luminometer (Centro LB 960, Berthold Laboratories) ermittelt.

Im Anschluss erfolgt die Egalisierungsmessung, welche durch die Aktivität der Renilla- Luziferase definiert ist. Hierfür wird jeder Ansatz durch je 30 µl eines Gemisches aus „Stop and Glo- Puffer“ (Promega, Mannheim) mit 1 % „Stop and Glo- Substrat“ (Promega, Mannheim) ergänzt.

Die Gesamtauswertung des Reporter- Assays zur Ermittlung der Promotor- Aktivität unter Berücksichtigung der Normalisierung ergibt sich aus der Quotientenbildung beider Messungen („Firefly- Luziferase“/ „Renilla- Luziferase“).

DNA- Konstrukt	Vektor	Insert	Herkunft
cis- NFAT- Luc	cis- NFAT	drei hintereinander geschaltete NFAT- Bindungsstellen	Stratagene, Garden Grove, USA
c- myc- wt- Luc	pBV-Luc	c- myc- Promotor -2448- +334	J. Massagué, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA
c- myc- Del- 2- Luc	pBV-Luc	c- myc- Promotor -1237- +334	AG Ellenrieder, Innere Medizin, Ulm, Deutschland
c- myc- Del- 3- Luc	pBV-Luc	c- myc- Promotor -783- +334	AG Ellenrieder, Innere Medizin, Ulm, Deutschland
c- myc- Del- 4- Luc	pBV-Luc	c- myc- Promotor -527- +334	AG Ellenrieder, Innere Medizin, Ulm, Deutschland
c- myc- Del- 5- Luc	pBV-Luc	c- myc- Promotor -279- +334	AG Ellenrieder, Innere Medizin, Ulm, Deutschland
c- myc- Del- 6- Luc	pBV-Luc	c- myc- Promotor -109- +334	AG Ellenrieder, Innere Medizin, Ulm, Deutschland

c- myc- Del- 7- Luc	pBV-Luc	c- myc- Promotor -26- +334	AG Ellenrieder, Innere Medizin, Ulm, Deutschland
c- myc- TIE- wt- Luc	pGL3-Enhancer	c- myc- Promotor -62- (-93) wt	AG Ellenrieder, Innere Medizin, Ulm, Deutschland
c- myc- TIE- NFAT- mut.	pGL3-Enhancer	c- myc- Promotor -62- (-93) NFATmut., NFAT- Bindungsstelle mutiert	AG Ellenrieder, Innere Medizin, Ulm, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Luziferase- Promotorkonstrukte

DNA- Konstrukt	Vektor	Insert	Herkunft
NFATc1	pBluescript II KS +	NFATc1 full length	A. Rao, Harvard Medical School, Boston, USA
NFATc2	pcDNA3.1 +	NFATc2 full length	A. Rao, Harvard Medical School, Boston, USA

Tabelle 5: Verwendete Effektorplasmid- Konstrukte

2.5.1. Calcineurin- Assay

Die Bestimmung der Calcineurin- Phosphatase- Aktivität beruht auf der photometrischen Messung der Extinktionen bei 620 nm eines freien Phosphatrests, der von einem synthetisch hergestellten Phosphopeptidsubstrat durch die Calcineurin- Phosphatase abgespalten wird. Die Lichtemissionsmessung zur Auswertung dieses Assay geschieht ebenso, wie der zuvor beschriebene Reporter- Assay- Ansatz, mit Hilfe eines Luminometers.

Zur Versuchsdurchführung wird sich dem „Biomol Green- cellular Calcineurin Assay Kit plus AK- 816“ (Biomol international, Lörrach) bedient und entsprechend den Protokollangaben des Herstellers gearbeitet.

2.6. RNA- Analyse

2.6.1. RNA- Extraktion

Zur Gewinnung von RNA wird in dieser Arbeit ein spezielles Arbeits- Kit, „RNeasy- Mini- Kit“, zu Hilfe herangezogen (Quiagen, Hilden) und entsprechend den Angaben des Kit- Herstellers gearbeitet.

In einem ersten Schritt wird das Medium der Zellen entfernt und diese einmalig mit gekühltem DPBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen aus den Well- Platten wird ein spezieller Puffer aus dem Kit eingesetzt, RLT- Puffer, der mit β - Mercaptoethanol versetzt wird. Die Zellen werden manuell mit Hilfe eines Zellscrapers im Puffer gelöst und mit einer Spritze homogenisiert. In einer Vielfalt weiterer Isolierungs- und Aufreinigungsschritte wird die RNA- Nukleinsäure gewonnen.

2.6.2. cDNA- Synthese (complementary- DNA- Synthese)

Kommen in weiteren Arbeitsschritten DNA- Polymerasen zum Einsatz, ist es nötig, die im vorherigen Schritt gewonnene RNA in komplementäre einzelsträngige DNA (cDNA, complementary- DNA) umzuschreiben. Die elementare Reaktion wird hierbei von einer Reversen Transkriptase, einer RNA- abhängigen DNA- Polymerase, geleistet. Da eukaryontische mRNA an ihrem 3' Ende mit einem Poly- A- Schwanz, eine Kette mehrerer Adeninbasen, ausgestattet ist, wird als Primer ein Oligo- dT (Thymidin)- Nukleotid eingesetzt, das komplementär dem Poly- A- Schwanz ist. Der Einsatz von Primern, kurze komplementäre DNA- Sequenzen, ist für den Reaktionsstart der Transkription durch die Reverse Transkriptase von Nöten, um im Folgenden desoxygenierte Nukleotide komplementär zur mRNA- Matrize an den Primer anzufügt. Zur Bewerkstelligung dieser Reaktionskaskade wird ein spezielles cDNA- Synthese- Kit verwendet (Qiagen, Hilden).

Zur Hybridisierung der gewonnenen mRNA werden 2 μ g RNA (Konzentrationsbestimmung mittels photometrischer Ermittlung) mit 0,5 μ l Oligo- Primern versetzt, auf 11 μ l destilliertes Wasser ergänzt und für fünf Minuten bei 70 °C im Hitzeblock erwärmt. Anschließend wird das Gemisch auf Eis abgekühlt.

Die endgültige cDNA- Synthese erfolgt über 60 Minuten bei 37 °C im Heizblock. Hierfür wird jeder Ansatz mit folgenden Substanzen vervollständigt:

2	µl	5mM dNTPs	(Stratagene, Garden Grove, USA)
2	µl	10x Puffer RT	(Quiagene, Hilden)
0,5	µl	RNase Inhibitor	(Ambion, Austin, TX, USA)
1	µl	Polymerase	(Fermentas, St. Leon- Rot)
3,5	µl	H ₂ O	

2.6.3. Quantitative Real Time- PCR

Die Abkürzung PCR steht für „Polymerase- Kettenreaktion“ („polymerase- chain- reaction“) und bietet in der Molekularbiologie die Möglichkeit zur Amplifizierung willkürlich bestimmter Nukleinsäuresequenzen, um so beispielsweise die Expression eines bestimmten Gens auf mRNA- Ebene nachzuweisen. Bei der Methode der „quantitativen Real- Time- PCR“ ist es möglich, die exponentielle RNA- Vervielfältigungen während eines PCR- Zyklus auf Grund von proportionalen Fluoreszenzreaktionen zu erfassen. In dieser Arbeit wurde als Fluoreszenzfarbstoff „SYPR- Green“ gewählt, das sich in die amplifizierte DNA ein- bzw. an diese anlagert. Als Prinzip liegt der Polymerase- Kettenreaktion ein sich vielfach wiederholender Zyklus von (DNA-) Denaturierungs-, (Primer-) Hybridisierungs- und (RNA-) Amplifizierungsreaktionen zu Grunde. Hierbei unterliegt jeder Teilschritt der PCR, abhängig vom Einsatz des Primers, einem exakt definierten Zeit- und Temperaturschema, das in einem PCR- Gerät (7500 fast Real- time PCR System, Applied Biosystems) programmiert wird:

1.	Denaturierung:	95 °C	10 Minuten
2.	Denaturierung:	95 °C	15 Minuten
3.	Primerhybridisierung/ Annealing:	primerspezif. Temp.	1 Minuten
4.	Elongation:	72 °C	1 Minuten
5.	Elongation:	72 °C	10 Minuten

Pro Probe (in dreifach- Bestimmung) wird folgender Ansatz in einer 96- Well- Platte angesetzt:

1 µl	1:10 verdünnte cDNA
10 µl	2x SYPR Green (Applied Biosystems, Darmstadt)
0,1 µl	10 pmol Primer rev
0,1 µl	10 pmol Primer for
8,8 µl	H ₂ O

Primer	Sequenz	Annealing Temp.	Herkunft
NFAT c1- RT- for.	5'-TGCAAGCCGAATTCTCTGG -3'	54 °C	Biomers GmbH, Ulm
NFAT c1- RT- rev.	5'-GGGAAGGTAGGTGAAACGCTG-3'	55°C	Biomers GmbH, Ulm
NFAT c2- RT- for.	5'-GTTCTACCCACAGTCATTCAG-3'	54°C	Biomers GmbH, Ulm
NFAT c2- RT- rev.	5'-CCCGCAGGTAATACTTCCTTTTG-3'	56°C	Biomers GmbH, Ulm
XS13- RT- for.	5'-GTCGGAGGAGTCGGACGAG-3'	54 °C	Biomers GmbH, Ulm
XS13- RT- rev.	5'-GCCTTTATTTTCCTTGTTTGCAAA-3'	56 °C	Biomers GmbH, Ulm

Tabelle 6: Verwendete Primer zur „quantitativen Real- Time- PCR“

2.7. Proteinanalyse

2.7.1. Proteinextraktion

2.7.1.1. Gesamtzelllysat

Zur Erstellung eines Gesamtzelllysats werden die Zellen mit ca. 1 ml gekühltem DPBS gewaschen. Anschließend wird je nach Wellgröße zwischen 40 µl und 100 µl Lysepuffer auf die Zellen gegeben und diese mit Hilfe eines Zellscrapers aus den Wellplatten gelöst. Die in Lysepuffer aufgenommenen Zellen werden in ein 1,5 ml

Eppendorfreaktionsgefäß überführt und sonifiziert. Danach wird zur Trennung der Zellbestandteile fünf Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand, in dem sich die Zellproteine befinden, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Lysepufferlösung:

12,50	ml	1 M HEPES (pH 7,5)
7,50	ml	5 M NaCl
1,25	ml	200 mM EGTA
25,00	ml	100 % Glycerin
2,50	ml	Tritron X-100 (Roth GmbH, Karlsruhe)
1,05	g	NaF
1,115	g	Na ₄ P ₂ O ₇ x 10 H ₂ O

Lysepuffer:

10	ml	Lysepufferlösung
200	µl	Orthovandat (Sigma aldrich Chemie GmbH)
10	µl	Leupeptin (Sigma aldrich Chemie GmbH)
200	µl	Benzamidin (Sigma aldrich Chemie GmbH)
100	µl	PMSF (Sigma aldrich Chemie GmbH)
10	µl	Aprotinin (Sigma aldrich Chemie GmbH)

2.7.1.2. Nukleäres Zelllysats

Zur Erstellung eines nukleären Zelllysats werden die Zellen mit ca. 1 ml gekühltem DPBS gewaschen. Anschließend wird je nach Wellgröße ca. 1 ml gekühltes DPBS auf die Zellen gegeben und diese mit Hilfe eines Zellscrapers aus den Wellplatten gelöst. Die in DPBS aufgenommenen und resuspendierten Zellen werden in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für drei Minuten bei 4 °C und 1200 rpm wird der Überstand verworfen und das zurückbleibende Zellpellet je nach Größe in 30- 100µl Lysepuffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellmembran inkubiert das Gemisch für ca. 15 Minuten auf Eis. Zur Trennung der zytoplasmatischen Bestandteile von den Zellkernen wird bei 3600 rpm und 4 °C für 10- 15 Minuten zentrifugiert. Der

entstandene Überstand mit den zytoplasmatischen Bestandteilen wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das zurückbleibende Zellkern- Pellet wird je nach Größe in 40- 100 µl Lysepuffer resuspendiert, für zehn Minuten auf Eis inkubiert und anschließend sonifiziert. Danach schließt sich eine weitere Inkubationszeit von fünf Minuten auf Eis an, bis dann zur Trennung der nukleären Proteine von den Kernmembrantrümmern bei 13.000 rpm und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert wird. Das hierbei entstehende Zelltrümmerpellet wird verworfen und der Überstand, in dem die nukleären Proteine gelöst sind, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Puffer A- Lösung:

200	µl	1 M HEPES KOH-Lösung, pH 7,5
100	µl	1 M KCl
100	µl	1 mM EGTA
10	µl	1 mM DTT
100	µl	0,5 mM Protease Arrest (G- Biosciences)
9,5	ml	destilliertes Wasser

2.7.2. Proteinkonzentrationsbestimmung der Zellysatproben

Um in nachfolgenden Versuchen vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es notwendig, gleiche Proteinkonzentrationen einzusetzen. Dies wird durch die quantitative Proteinbestimmung nach Bradford ermöglicht (Bradford 1976). Diese hoch sensitive Methode arbeitet nach dem Prinzip der Verschiebung des Absorptionsspektrums unter dem Vorhandensein von Proteinen. In der Abwesenheit von Proteinen besitzt der Triphenylmethan- Farbstoff Coomassie- Brilliant-Blau G- 250 (CBBG) ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Unter dem Einfluss von Proteinen kommt es zur Komplexbildung zwischen dem Farbstoffmolekül und den Seitenketten der Proteine, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 595 nm nach sich zieht.

Durchgeführt wird die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels einer kommerziellen Protein- Assay- Lösung (Bio- Rad, Hercules, USA). Hierzu wird in eine 96- Well- Platte 100µl dieser Assay- Lösung pro Well vorgelegt und mit je 2 µl einer Probe ergänzt. Entsprechend der Proteinkonzentration kann ein Farbumschlag von braun nach

blau beobachtet werden. Das Gemisch wird dann mit nochmals 100 µl Protein- Assay-Lösung überschichtet. Alle Proben werden in Doppelbestimmung aufgetragen.

Zur Erstellung einer Kalibrierungskurve wird in verschiedenen Konzentrationen BSA (bovines Serumalbumin) (New England Biolabs) eingesetzt. Detektiert werden die verschiedenen Extinktionswerte im Photometer (Dynatech MRX Laboratorius).

2.7.3. SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Die SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese dient als Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Um als Auftrennungskriterium das Molekulargewicht der Proteine wählen zu können, muss gewährleistet sein, dass die Eigenladungen der Proteine aufgehoben sind. Hierfür werden die Proteinproben in der Probenvorbereitung im Überschuss mit SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat) angereichert. Um die Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine zu überwinden, wird den Proben DTT (Dithiothreitol) zugeführt, um Schwefeldisulfidbrücken zu zerstören. Durch eine Erwärmung auf 95 °C für fünf Minuten werden vorhandene Wasserstoffbrückenbindungen unterbrochen, was ebenfalls im Sinne der Denaturierung liegt. Nach kurzer Abkühlung der Proben auf Eis kann mit den Proben das Gel beladen werden.

Zur Präparation 10 %iger Gele wird folgendes Grundschema angenommen, wobei sich die Wahl zur Konzentration des Gels nach der Größe der zu detektierenden Proteine richtet. Die Gelkonzentration lässt sich vor allem durch den Anteil des Acrylamids variieren.

Sammelgel- Puffer:

12,11 g/ 200 ml	0,5 M Tris Base (pH 6,8)
4 ml	0,4 % SDS

Sammelgel- Lösung:

25 ml	Sammelgel- Puffer
59 ml	destilliertes Wasser
16 ml	30 %/ 0,8 % Acrylamidlösung (Roth GmbH, Karlsruhe)

Trenngel- Puffer:

36,34 g / 200 ml	1,5 M Tris Base (pH 8,8)
4 ml	0,4 % SDS

Trenngel- Lösung (für 2 Gele à 10 %):

2,5 ml	Trenngel- Puffer
3,67 ml	destilliertes Wasser
3,33 ml	30 %/ 0,8 % Acrylamidlösung
0,5 ml	Glycerol (Sigma aldrich Chemie GmbH)

Stoppgel- Lösung:

200 µl	Trenngel- Lösung
3 µl	10 % APS
3 µl	TEMED

Zunächst wird das Stoppgel zwischen die zwei mit 70 %igem Ethanol gereinigten Glasplatten gegeben, die mit Hilfe zweier Spacer im nötigen Abstand von einander gehalten werden. Nach Aushärten dieser untersten Schicht des Gels werden der vorbereiteten Trenngel- Lösung je 20 µl des Radikalstarters APS (Ammoniumpersulfat) und des Polymerisierungskatalysators TEMED (Tetramethylethylendiamin) hinzugefügt und dem Stoppgel aufgeschichtet. Für die oberste Schicht werden für jedes der zwei Gele 2 ml Sammelgel- Lösung berechnet, die gemeinsam mit 10 µl APS und 5 µl TEMED angesetzt werden. Zur Formung der Taschen für die Proben werden Kämme bis zum Ende der Polymerisation in die Sammelgel- Schicht platziert.

Die Proben werden in einer Größenordnung zwischen 10 µg und 20 µg eingesetzt. Für die spätere Beurteilbarkeit der Molekulargewichte ist es für jedes Gel obligat 3 µl eines geeigneten Größenmarkers (hier Page Ruler, Fermentas) in einer Bande mitlaufen zu lassen.

Die beladenen Gele werden in speziellen Gelelektrophoresekammern (Thermo Scientific) platziert, die mit einfachkonzentriertem Laufpuffer gefüllt sind. Die Anfangsspannung beläuft sich auf ungefähr 120 V. Nachdem die Proben das Sammelgel verlassen haben, wird die Spannung auf 160 V erhöht.

2.7.4. Western Blot

2.7.4.1. „Elektro- Tank- Blotting“

Die Methode des Western- Blots wird zum Transfer der durch die SDS- Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine immobilisierende Trägermembran, Nitrocellulosemembran (Whatman GmbH, Dassel), verwendet. Die anschließende Visualisierung der übertragenen Proteine erfolgt mittels spezifischen Antikörperreaktionen gegen die entsprechenden Proteine. Zumeist wird ein zweiteiliges System verwendet, das aus einer primären und einer sekundären Antikörperreaktion besteht. Der primäre Antikörper ist gegen proteinspezifische Epitope gerichtet. Er ist somit für die Detektion des zu untersuchenden Proteins verantwortlich. Der sekundäre Antikörper stellt einen Enzym- konjugierten Antikörper dar, der in der Lage ist, an den primären Antikörper zu binden. In dieser Arbeit kommen ausschließlich HRP- gekoppelte Antikörper zum Einsatz (englisch „horseradish peroxidase“, Meerrettichperoxidase), die eine Chemilumineszenzreaktion von Luminol katalysieren, die ihrerseits auf einem Röntgenfilm sichtbar wird.

Der Proteintransfer erfolgt in dieser Arbeit mittels „Elektro- Tank- Blotting“- Technik (Towbin et al. 1979). Für eine Übertragung nach diesem System wird eine Transferkassette präpariert, in der die einzelnen Komponenten wie folgt angeordnet sind:

Kathode- Schwamm, Filterpapier, Gel, NC- Membran, Filterpapier, Schwamm- Anode

Die Membran wird anodenseitig ausgerichtet, da die Proteine durch die vorige SDS- Behandlung mit einer negativen Nettoladung ausgestattet sind und so folglich unter angelegter Spannung zur Anode wandern. Eingesetzt in eine mit Blotting- Puffer gefüllte Mini- Trans- Blot- Kammer (BioRad, Hercules, USA) erfolgt der Übertragungsprozess bei 400 mA für 1:40 Stunden bei 4 °C.

10x Transblott Puffer:

151,4 g/ 5 l 0,25 M Tris Base

720,65 g/ 5 l Glycerin

Blotting-Puffer:

100	ml	10 x Trans-Blot Puffer
200	ml	Methanol (Fluka)
700	ml	destilliertes Wasser

Im Anschluss an den Transferprozess werden die Proteinbanden auf der NC- Membran durch eine Anfärbung mit Ponceau S (Sigma aldrich Chemie GmbH) sichtbar gemacht. Dieser Arbeitsschritt dient zum einen der Visualisierung der Transferqualität und zum anderen der ersten Kontrolle einer homogenen Proteinbeladung. Nach Zuschneiden und Entfärben der Membran mit TBST- Puffer, wird diese mit 5 %igem Milchpuffer (Roth GmbH, Karlsruhe) für eine Stunde auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur geblockt, wodurch eine Unterdrückung unspezifischer Bindungsstellen gewährleistet wird.

10x TBST-Puffer:

121,40	g/5 l	0,2 M Tris Base
400,31	g/5 l	1,37 M NaCl

1x TBST:

100	ml	10x TBST-Puffer
900	ml	destilliertes Wasser
1	ml	Tween 20 (Sigma aldrich Chemie GmbH)

Blocking-Puffer:

1x TBST
5 % Milchpulver (Roth GmbH, Karlsruhe)

Die geblockte Membran wird mit dem proteinspezifischen Primärantikörper in der vorgegebenen Konzentration auf einem Kippschüttler bei 4 °C über Nacht inkubiert. Vor dem Einsatz des HRP- gekoppelten Sekundärantikörpers wird die Membran durch Waschen mit TBST vom ersten Antikörper gesäubert. Der zweite Antikörper wird dann in einer Verdünnung von 1: 5000 in 5 %igem Milchpuffer angesetzt und für eine Stunde auf die Membran gegeben. Danach ist eine erneute Reinigung der Membran mit TBST notwendig, um ungebundene Antikörper von der Membran zu entfernen.

Die Visualisierung erfolgt mit Hilfe des ECL- Systems (GE Healthcare, München). Dieses liefert Luminol als notwendiges Substrat für die Chemolumineszenzreaktion, die durch die „horseradish- Peroxidase“ (HRP) katalysiert und auf einem Röntgenfilm (GE Healthcare, München) sichtbar wird. Die Expositionszeit des Röntgenfilms variiert dabei je nach Stärke des Luminiszenzsignals.

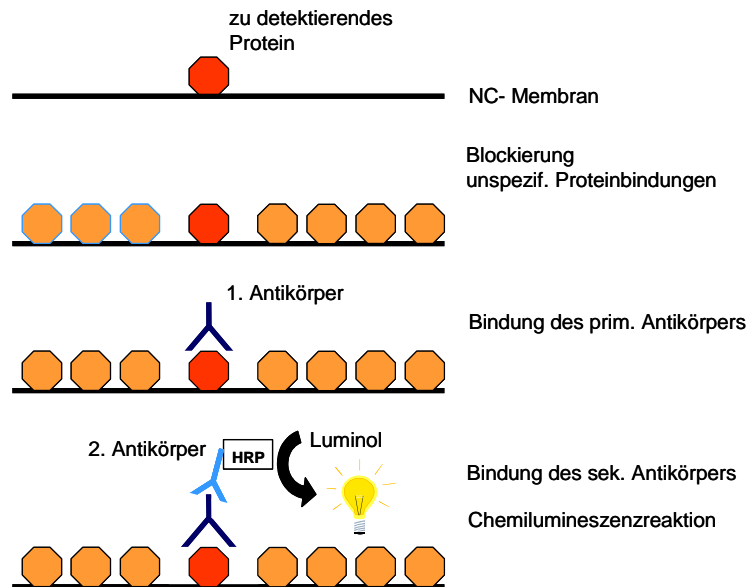


Abb. 9: Prinzip der Chemilumineszenzreaktion
(in Anlehnung an das „Proteinchemie III“- Skript, Uni Hamburg)

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Herkunft
β- Aktin	1: 4000	Anti- mouse	Sigma aldrich Chemie GmbH
c- fos	1: 500	Anti- rabbit	Abcam, Cambridge, UK
c- jun	1: 500	Anti- rabbit	Abcam, Cambridge, UK
c- myc	1: 200	Anti- mouse	Santa Cruz, Heidelberg
Cyclin D1	1: 1000	Anti- mouse	Cell Signaling technology
Cyclin D3	1: 2000	Anti- mouse	Cell Signaling technology
Cyclin E	1: 1000	Anti- mouse	Cell Signaling technology
EGR- 1	1: 500	Anti- rabbit	Cell Signaling technology
ERK	1: 1000	Anti- rabbit	Cell Signaling technology
Lamin A/ C	1: 1000	Anti- rabbit	Cell Signaling technology

Lamin B	1: 1000	Anti- goat	Cell Signaling technology
NFAT c2	1: 500	Anti- mouse	Santa Cruz, Heidelberg
NFAT c1	1: 1000	Anti- mouse	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper zur Western- Blot- Analyse

Sekundärantikörper	Verdünnung	Herkunft	Link
Anti- mouse- Ak IgG	1: 5000	Cell Signaling technology	HRP
Anti- rabbit- Ak IgG	1: 5000	Cell Signaling technology	HRP
Anti- goat- Ak IgG	1: 5000	Santa Cruz, Heidelberg	HRP

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper zur Western- Blot- Analyse

2.7.4.2. Entfernung gebundener Primärantikörper von NC- Membranen („Strippen“)

Um eine bereits Antikörper- gebundene Membran mit einem weiteren Antikörper behandeln zu können, der ein Protein mit ähnlichem Molekulargewicht detektiert wie der erste, wird die Membran mit Hilfe einer speziellen Stripp- Lösung (Sigma aldrich Chemie GmbH) bearbeitet. Hierfür wird die NC- Membran für 10 Minuten in der Stripp- Lösung bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert. Nach Waschen der Membran mit TBST wird diese anschließend mit 5 %igem Milchpuffer für eine Stunde auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur geblockt. Danach kann der neue Primärantikörper aufgetragen werden.

2.7.5. DNA- Pulldown- Assay

Die molekularbiologische Methode der DNA- Pulldown- Assay- Technik dient dem Nachweis von physikalischen Protein- DNA- Interaktionen. Über eine Verkettung von gebundenen Proteinen an eine synthetisierte Oligonukleotidsequenz des Interesses,

spezifischem Antikörper und Streptavidin- Agarose- Beads kann letztendlich der zu untersuchende Protein- DNA- Komplex isoliert und im Western- Blot- Verfahren nachgewiesen werden.

Nach entsprechender Vorbehandlung werden nukleäre Zelllysate geerntet und in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Zur Anlagerungsreaktion der Proteine des gewonnenen Zelllysats an die zu untersuchende DNA- Sequenz werden 100 µg des Lysats mit 10 µl Biotin- markierter DNA- Oligonukleotidsequenz- Lösung vermischt und in einem Überkopfroter bei 4 °C über einen Zeitraum von vier Stunden inkubiert. Im Anschluss werden jeder Probe 60 µl Streptavidin- gekoppelte Agarose- Beads (Sigma aldrich Chemie GmbH) hinzugefügt und für eine weitere Stunde im Überkopfroter inkubiert. Um unspezifische Bindungen zu entfernen, werden die Proben anschließend mehrmals mit Lysepuffer unter Zentrifikation bei 4 °C und 5000 rpm gewaschen. Die aufgereinigten Probe- Pellets werden mit 50 µl Lämmli- Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C erwärmt, was der Denaturierung der Proteine und dem Lösen von den Beads dient.

Die Proben werden zum Nachweis der gebundenen Proteine an die hinzugegebene DNA- Oligonukleotidsequenz mittels Western- Blot- Analyse mit einem Volumen von 20 µl auf ein SDS- Gel aufgebracht. Die entsprechenden Proteine des Interesses können mittels ihrer entsprechenden Antikörper im ECL- System nachgewiesen werden.

Lämmli-Puffer:

2,25	ml	1M Tris Base/HCl (pH 6,8)
5	ml	100% Glycerin
2,5	ml	20% SDS
1	ml	1M DTT
0,02	%	Bromphenolblau

2.8. Funktionelle Assays

2.8.1. Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie findet ihren Einsatz in mannigfaltigen Untersuchungen, in denen die Fragestellung nach Zelleigenschaften im Vordergrund steht. In dieser Arbeit wird die Methode für Zellzyklusanalysen genutzt, wozu zwei verschiedene Messungen herangezogen werden. Zum einen kommen die unterschiedlichen Emissionsverhaltensweisen von Zellen während ihrer Passage von Laserstrahlen zum Tragen und zum anderen wird die Fluoreszenzintensität der Zellen gemessen, die sich in Abhängigkeit zu ihrer DNA- Konzentration befindet.

Die in 6- Well- Platten ausgesäten und entsprechend behandelten Zellen werden einmalig mit gekühltem DPBS gewaschen. Der Zellrasen wird durch die Behandlung mit 0,5 ml Trypsin für drei Minuten im Brutschrank vom Boden gelöst. Die Zell-Trypsin- Suspension wird mit demselben Volumen an serumhaltigem Medium ergänzt und in ein 15 ml Falcon- Röhrchen überführt, in das 2 ml Medium vorgelegt werden. Anschließend werden die Zellen bei 3000 rpm für drei Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird vom Mediumüberstand befreit und in 200 µl DPBS resuspendiert. Die Zellsuspension wird in 2 ml eisgekühltes Ethanol unter ständigem Vortexen eingetropft. Die Fixierung in Ethanol geschieht über Nacht, wobei unter diesen Konditionen eine längere Lagerung möglich ist.

Zwei bis drei Stunden vor Messung der Zellen mittels der Methode der Durchflusszytometrie müssen die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff, hier Propidiumjodid, angereichert werden, das sich in die DNA der Zellen interkaliert. Hierfür werden die Zellen vom Ethanol bei 3000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert und mit einem Staining- Puffer, der den Fluoreszenzfarbstoff enthält, versetzt. Das Volumen des Staining- Puffers variiert je nach Größe des Zellpellets zwischen 100 µl und 300 µl.

Stainingpuffer:

5,676	ml	DPBS
300	µl	Propidiumjodid (Sigma aldrich Chemie GmbH)
21	µl	DNase freie RNase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Die Zellzyklusfraktionen werden am „Becton dickinson FACScan“- Durchflusszytometer unter Verwendung der „Cell Quest“- Software gemessen und mit Hilfe der „Win MDI 2.8“- und „Cylchred“- Software im Anschluss ausgewertet.

2.8.2. Proliferations- Assay

Durch den Einbau des Isotops [H^3]- Thymidin gelingt es, laboranalytisch Zellen in ihrem Proliferationsverhalten zu untersuchen. Das Prinzip dieses quantitativen Nachweis- Assays basiert auf der Interkalation von radioaktiv- markiertem [H^3]- Thymidin in die neusynthetisierte DNA im Verlaufe des Zellzyklus. Auf Grund der radioaktiven Markierung ermöglicht sich die Erfassung der neureplizierten DNA im β - Counter.

Die in 12- Well- Platten ausgesäten und entsprechend vorbehandelten Zellen werden mit 0,5 mCi/ ml [H^3]- Thymidin überschichtet und für fünf Stunden in einem 37 °C warmen Brutschrank mit einer Atmosphäre von 5 % CO_2 inkubiert. Das Thymidin- haltige Medium wird nach der entsprechenden Inkubationszeit von den Zellen durch Absaugen und dreimaligem Waschen mit einer 5 %igen Trichloressigsäure- Lösung (Trichloracid, TCA) entfernt. Anschließend wird auf den Zellrasen 500 μ l einer 1 M NaOH- Lösung pipettiert und über einen Zeitraum von 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten und resuspendierten Zellen werden in spezielle Scintillationsgefäße (Sarstedt AG und Co, Nürmbrecht) überführt, die mit 5 ml „Rotiszint“ Scintillatinsflüssigkeit (Roth GmbH, Karlsruhe) gefüllt sind. Die radioaktive Extraktion, die ein Maß der neusynthetisierten DNA- Menge widerspiegelt, wird schlussendlich im β - Counter (Global Medical Instrumentation) gemessen.

2.9. Immunfluoreszenzfärbung

Über die Markierung von Proteinen mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes wird die Methode der Lichtmikroskopie zugänglich für Aussagen über die intrazelluläre Lokalisation von einzelnen Proteingruppen. So können Angaben über die subzelluläre Lokalisation von Proteinen, ihre Änderung der Lokalisation in Antwort auf einen

bestimmten Stimulus (z. B. Serum) oder das Verhältnis verschiedener Proteingruppen zueinander getroffen werden.

Das Prinzip der „indirekten Immunfluoreszenzfärbung“, der sich in dieser Arbeit bedient wird, basiert auf dem Einsatz eines gekoppelten Antikörper- Systems. Der primäre Antikörper richtet sich gegen das Epitop des zu detektierenden Proteins, während der sekundäre Fluoreszenz- markierte Antikörper mit dem primären Antikörper interagiert und somit den indirekten Nachweis für das Protein liefert.

Die Zellen werden auf Deckgläschen oder speziell für mikroskopische Untersuchungen angefertigte „Chamber- Slides“ (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark) ausgesät und entsprechend vorbehandelt. Nach abgeschlossener Vorbehandlung werden die Zellen von ihrem Medium befreit und dreimal mit PBS++ gewaschen. Zur Fixierung der Zellen auf ihrem Untergrund wird eine 4 % Paraformaldehydlösung in PBS++ angesetzt und für 10 Minuten auf den Zellrasen gegeben. Durch zweimaliges Waschen mit PBS++ wird die Paraformaldehydlösung von den Zellen entfernt. Um die Zellmembran zu Permeabilisieren kommt eine in PBS++ verdünnte 0,2 %ige Triton X- Lösung (Roth GmbH, Karlsruhe) zum Einsatz, die für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden durch Hinzugabe von 10 % FCS, gelöst in PBS++, unspezifische Bindungen maskiert. Nach 10 Minuten wird der primäre Antikörper in einem Verhältnis von 1: 100 hinzugefügt und über einen Zeitraum von einer Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Visualisierung ist der Einsatz eines fluoreszierenden sekundären Antikörpers von Nöten. Im Rahmen der hier durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung wird „Alex Rot“ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in einem Verhältnis von 1: 500, gelöst in 10 % FCS in PBS++, verwendet. Die Inkubation über 30 Minuten muss dabei im Dunkeln erfolgen.

Um die Morphologie des Zellkernes darzustellen und somit eine objektive Differenzierung zwischen Cytoplasma und Zellkern zu erlangen, erfolgt die Anfärbung AT- reicher Regionen der DNA mit DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindolhydrochlorid) (Merck KGaA, Darmstadt). Hierfür wird 1 µl DAPI- Lösung in 10 ml PBS++ gelöst und für 30 Minuten auf die Zellen gegeben. Die Proben werden mit Deckgläschen versiegelt. Nach einer Trockenzeit über 30 Minuten können die Ergebnisse unter dem Mikroskop betrachtet und ausgewertet werden.

PBS++- Lösung:

1000 ml PBS
100 ml MgCl₂

Primärantikörper	Verdünnung	Herkunft
NFATc2	1: 100	Santa Cruz, Heidelberg

Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper der Immunfluoreszenzfärbung

Sekundärantikörper	Verdünnung	Herkunft
„Alexa Rot“	1: 500	Invitrogene GmbH, Karlsruhe

Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper der Immunfluoreszenzfärbung

3. Ergebnisse

3.1. Wachstums- und Proliferationsanalysen im Zellsystem des Pankreaskarzinoms

3.1.1. Proliferationsanalysen unter dem Aspekt des Serumeinflusses

In einem ersten Versuch zum Wachstums- und Proliferationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen sollte mittels der Methode des Thymidin- Assays der Einfluss von Serum auf die Proliferation untersucht werden. Zur optimalen Ausarbeitung der Serumeffekte wurden die Zellen vor Versuchsbeginn für 24 Stunden unter Serumentzug gesetzt, um dann über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 10 % FCS (fötales Kälberserum) stimuliert zu werden.

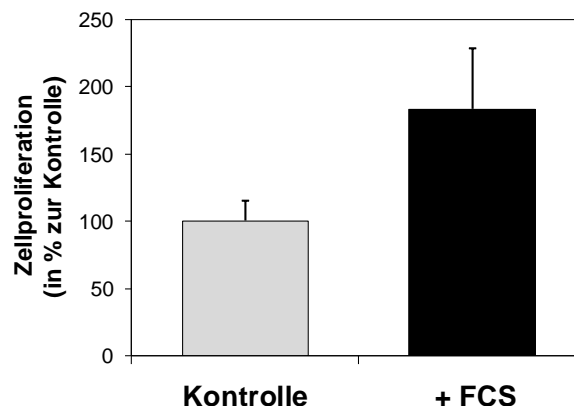


Abb. 10: Zellproliferationsanalyse mittels Thymidin- Assay zum Einfluss von Serum

8988t- Zellen wurden durch Einbau des Isotops $[H^3]$ - Thymidin in ihrem Proliferationsverhalten nach einer 24 stündigen Stimulation mit Serum (10 % FCS) untersucht. Als Kontrolle wurde ein Ansatz gewertet, dessen Zellen ausschließlich unter serumfreien Konditionen gehalten wurden. Ihre Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt. Im Vergleich zu ihrer Kontrolle wird eine Steigerung der Proliferationsrate um ungefähr 80 % unter dem Einfluss von Serum erkennbar.

In der Auswertung des Thymidin- Assays lässt sich eine deutliche Steigerung der Zellproliferation durch Applikation von Serum (10 % FCS) verzeichnen.

3.1.2. Zellzyklusanalysen unter dem Aspekt des Serumeinflusses

Neben dem Einfluss von Serum auf die Zellproliferation sollte auch der Effekt von Serum auf den Zellzyklus untersucht werden. Hierfür wurden unter oben genannten Konditionen FACS- Analysen in den Zellen der Pankreaskarzinomzelllinien IMIM-PC1 und 8988t durchgeführt.

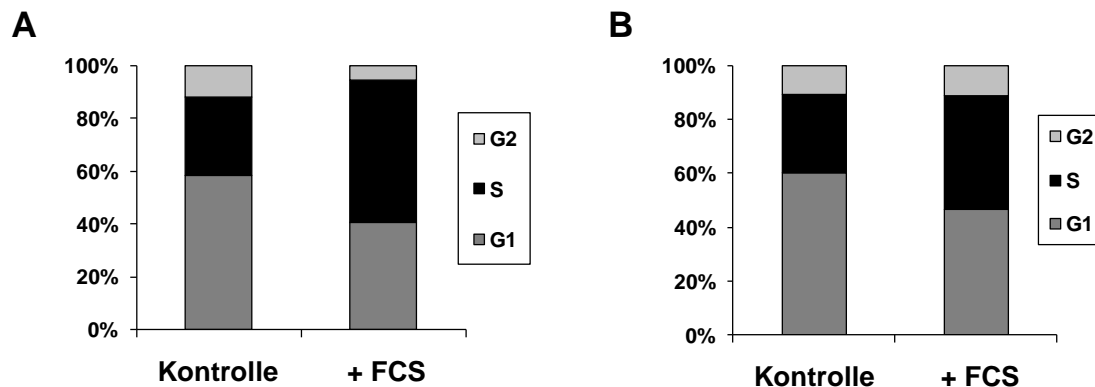


Abb. 11: Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie zum Einfluss von Serum

IMIM- PC1 (A) und 8988t (B) Pankreaskarzinomzellen wurden in zwei Kohorten unterteilt, die sich in ihrer Serumexposition (10 % FCS) voneinander unterschieden. Vor Versuchsbeginn wurde den Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden Serum entzogen, um die Zellen in ihren Zellzykluseigenschaften zu synchronisieren. Nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden wurden die Serum- behandelten Zellen und die Kontrollkohorte in ihren Zellzykluseigenschaften vermessen.

In beiden Zelllinien wird deutlich erkennbar, dass Serum (10 % FCS) den Übergang der Zellen von der G1- in die S- Phase fördert.

Im Gegensatz zu unbehandelten Zellen kommt es unter Behandlung mit Serum (10 % FCS) zu einer deutlichen Steigerung der Zellzyklus- Transition von der G1- in die S- Phase. In Zahlen ausgedrückt bedeutet dies für die Zelllinie IMIM- PC1, dass sich ein Anstieg der S- Phasen- Kohorte unter Serumeinfluss um mehr als 80 % registrieren lässt (von 29,35 % auf 54,25 %), während die G0/ G1- Phase um ca. 30 % absinkt (von 58,33 % auf 40,22 %). In der Zelllinie 8988t ergibt sich ein entsprechendes Bild. Während in den Kontrollzellen eine Phasenverteilung von 29,20 % in der S- Phase und 60,05 % in der G0/G1- Phase vorliegt, ändert sich dieses Verhältnis unter Serumeinfluss zum

Vorteil der S- Phase (42,20 % in der S- Phase, 46,18 % in der G0/G1- Phase). Anders ausgedrückt bedeutet es einen Abfall der G0/ G1- Phase um mehr als 20 % zu Gunsten der S- Phase, die um 45 % anwächst.

3.1.2.1. Zellzyklusanalyse unter den Konditionen einer zeitkinetischen Serumstimulation

In einem ergänzenden Versuch zur Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie sollte das zeitkinetische Profil einer Serumstimulation genauer aufgearbeitet werden. Die Versuchsgrundlagen wurden hierfür analog zu den vorangegangenen FACS-Analyse- Daten gewählt (Abb. 11). Die Zellen wurden in einem Zeitfenster von 32 Stunden mit Serum (10 % FCS) behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen.

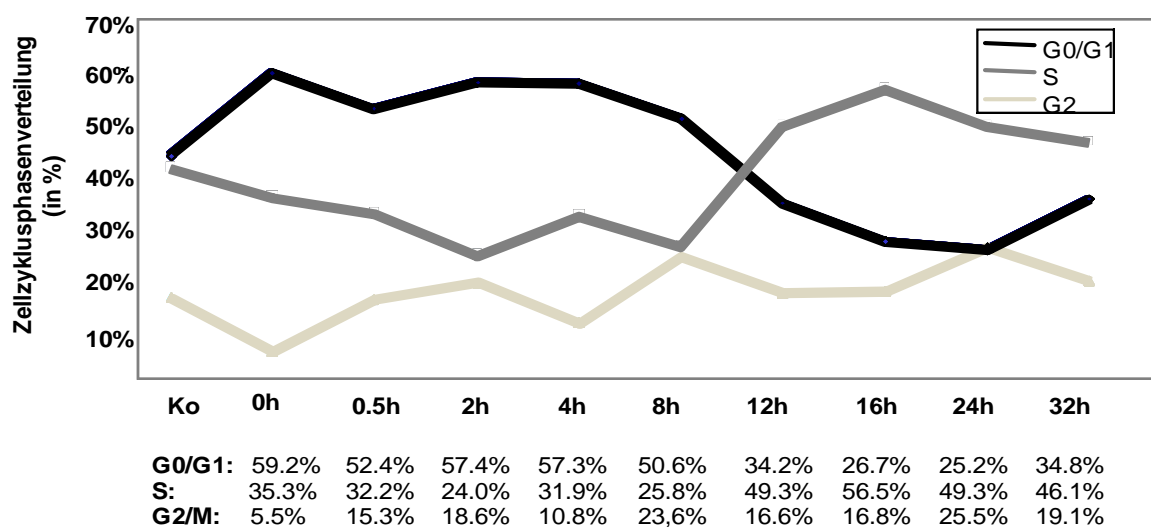


Abb. 12: Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie durch zeitkinetische Stimulationsansätze mit FCS

Die Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie 8988t wurden in einem Zeitfenster von 32 Stunden mit Serum (10 % FCS) stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten in ihren Zellzykluseigenschaften untersucht. Die Zellen wurden vor Beginn der Stimulationsreihe für 24 Stunden serumfrei gesetzt.

Im Laufe der Serumstimulation über einen Zeitraum von 32 Stunden lässt sich ein deutliches Durchwandern der verschiedenen Zellzyklusphasen von den Zellen erkennen. Zum Zeitpunkt des ausschließlichen Serumentzuges befindet sich der Großteil der Zellpopulation in einem G1- Arrest (59,2 %). Nach 16 Stunden Serumstimulation befinden sich dagegen nur noch 26,7 % der Zellen in der G0/ G1- Phase, wohingegen die S- Phase des Zellzyklus auf 56,5 % angewachsen ist.

Es wird deutlich, dass zum Zeitpunkt des Stimulationsbeginns („0 Minuten“), an dem ausschließlich serumfreie Konditionen vorliegen, sich der überwiegende Anteil der Zellpopulation in einem G1- Arrest des Zellzyklus befindet (59,2 % der Zellen befinden sich in der G0/ G1- Phase des Zellzyklus). Nach 12 Stunden Serumstimulation nimmt der Anteil an Zellen, der sich in der S- Phase des Zellzyklus befindet, drastisch zu. Es lässt sich erkennen, dass zwischen dem Zeitpunkt 8 Stunden Serumbehandlung (in dem 25,8 % der Zellenpopulation in der S- Phase vorliegen) und dem Zeitpunkt 12 Stunden (49,3 % in der S- Phase) der Hauptanteil der Zellen in die S- Phase des Zellzyklus übertreten. Nach 16 Stunden lässt sich das Maximum an Zellen in der S- Phase verzeichnen (56,5 %). Analog hierzu schrumpft die G0/ G1- Kohorte und macht zum Stimulationszeitpunkt nach 12 Stunden 34,2 % aller Zellen und zum Zeitpunkt nach 16 Stunden nur noch 26,7 % von ausgehenden 59,2 % („0 Minuten“) aus.

3.1.2.2. Der Einfluss von Serum auf die Expression zellzyklusregulierender Proteine

Im Folgenden sollte der Effekt von Serum auf die Expression G1-/ S- Phase-regulierender Proteine untersucht werden, deren Zyklusabhängigkeit bekannt ist (Shackelford et al. 1999).

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden zeitkinetische Expressionsreihen verschiedener Cycline auf Proteinebene in der Pankreaskarzinomzelllinie 8988t erstellt, die mittels Western- Blot- Technik ausgewertet wurden. Zur optimalen Ausarbeitung der Serumeffekte wurden die Zellen vor Versuchsbeginn für 24 Stunden unter Serumentzug gesetzt.

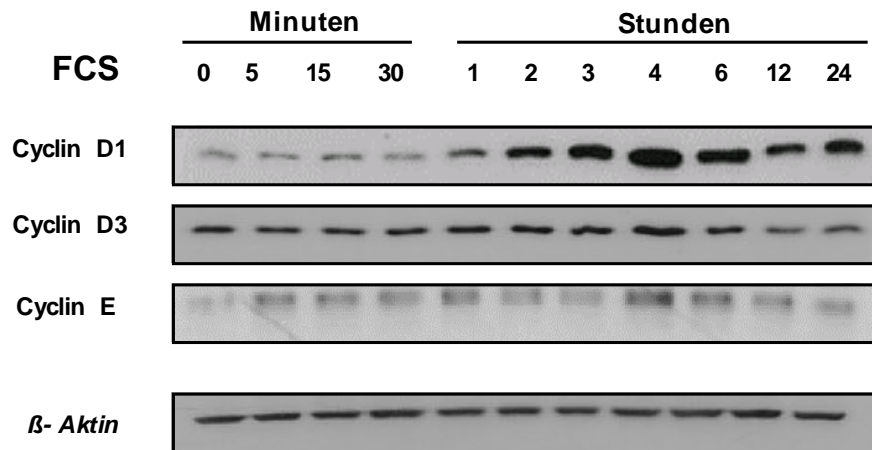


Abb. 13: Western- Blot- Analyse zur Serum- induzierten Cyclin- Expression

Der Immunoblot zeigt Gesamtzelllysate der Pankreaskarzinomzelllinie 8988t, die über die Zeit von 24 Stunden mit Serum (10 % FCS) stimuliert wurden. Die gewonnenen Proteinlysate wurden auf ein 10 %iges SDS- Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels ihrer entsprechenden Antikörper im ECL- System nachgewiesen.

Als Ladungskontrolle diente der Nachweis von β - Aktin.

Resultierend ergibt sich eine zeitkinetische Induktion der Cycline. Die Induzierbarkeit variiert hierbei zwischen den untersuchten Cyclinen. In der Pankreaskarzinomzelllinie 8988t lässt sich vor allem für Cyclin D1 und E (weniger Cyclin D3) eine verstärkte Serum- abhängige Expression beobachten. Die Zellen wurden vor Beginn der Stimulationsreihe für 24 Stunden serumfrei gesetzt. Diese Vorbehandlung gewährleistet, dass die Serumstimulationseffekte maximal zur Geltung kommen.

In den Western- Blot- Analysen lässt sich eine Induktion von Cyclin D1 erkennen. Tatsächlich lässt sich nach ca. zwei Stunden Stimulation eine deutliche Zunahme der Expression festhalten, die nach vier Stunden ihr Maximum erfährt. Ebenfalls lässt sich für Cyclin E eine Induzierbarkeit mit einem Maximum nach ca. vier Stunden auf Proteinebene feststellen, wenn auch durchaus schwächer in seiner Intensität. Weitestgehend konstant präsentiert sich die Expression von Cyclin D3.

Damit ließen sich die in der Durchflusszytometrie erhobenen Zellzyklusanalysen (Abb. 12) auch auf Proteinexpressionsebene belegen.

3.1.3. Der Einfluss von Serum auf die Expression von „Immediate early“-Transkriptionsfaktoren

Bislang konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Serum die Expressionsrate zellzyklusregulierender Proteine in Pankreaskarzinomzelllinien beeinflusst, was sich in einer Veränderung der Zellzyklus- und Proliferationsrate darlegt. In den folgenden Versuchen sollte es nun darum gehen, eine Gruppe an Transkriptionsfaktoren auf ihre Seruminduzierbarkeit zu untersuchen, die aus der Literatur für zellzyklusregulierende Eigenschaften bekannt ist.

An dieser Stelle lag es auf Grund aktueller wissenschaftlicher Kenntnisse nahe, die Familie der so genannten „Immediate early“- Gene als Zielgruppe auszuwählen. IEG-Proteine stellen Transkriptionsfaktoren dar, die per Definition in ihrer Induktion keine Proteinneusynthese voraussetzen und somit in unmittelbarer Reaktion auf einen Stimulus stehen (Fambrough et al. 1999; Murphy et al. 2003). Im Hinblick auf ihre mitogenen Eigenschaften spielen sie vor allem eine Rolle zur Zeit des Überganges von der G1- in die S- Phase des Zellzyklus (Murphy et al. 2003; Murphy et al. 2002).

3.1.3.1. Untersuchungen zur Regulierbarkeit von „Immediate early“- Genen unter Serumeinfluss auf RNA- Ebene

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit von „Immediate early“- Genen durch Serum wurde dies zuerst auf mRNA- Ebene überprüft. Hierfür wurde mittels „Real Time-PCR“ eine Zeitkinetik angefertigt. Entsprechend des Expressionscharakters der „Immediate early“- Gene wurden für die Kinetik frühe Zeitpunkte, von fünf Minuten bis zwei Stunden, gewählt. Überprüft werden sollten vor allem vier Gengruppen der IEG-Proteine: c- jun, c- fos, c- myc und Egr- 1. Als Versuchsvoraussetzung galt ein serumfreies Intervall von 24 Stunden vor Stimulationsbeginn.

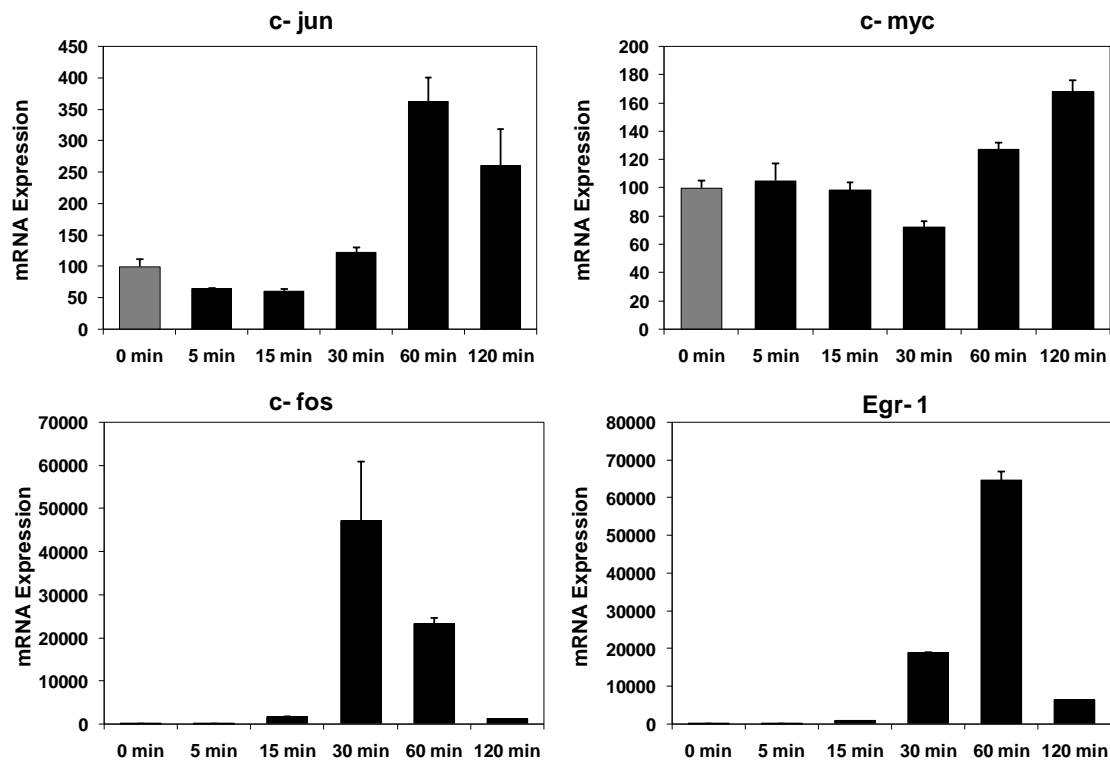


Abb. 14: „Real- Time- PCR“ zur Serum- regulierten „Immediate early“- Gen- Induktion im Panc- 1- Zellsystem

Die Zellen der Zelllinie Panc- 1 wurden für 24 Stunden vor Stimulationsbeginn (10 % FCS) unter Serumentzug gesetzt. Diese Konditionen entsprachen dem Zeitpunkt „0 Minuten“ in der Versuchsreihe. Im Folgenden wurde in einem Zeitfenster von 120 Minuten mit Serum behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Expression für c- jun, c- fos, c- myc und Egr- 1 in Gesamtzelllysaten gemessen.

Alle vier Gene zeigen sich in dem gewählten Zeitfenster als induzierbar, wobei c- fos schon nach 30 Minuten sein Expressionsmaximum erlangt, während c- jun und Egr- 1 dieses nach 60 Minuten erreichen. Ein etwas anderes Induktionsmuster wird von c- myc geboten, das sich mit einem schwächeren Anstieg präsentiert und nach 120 Minuten am stärksten ist.

Als Ladekontrolle wurde die Expression von XS 13 gemessen.

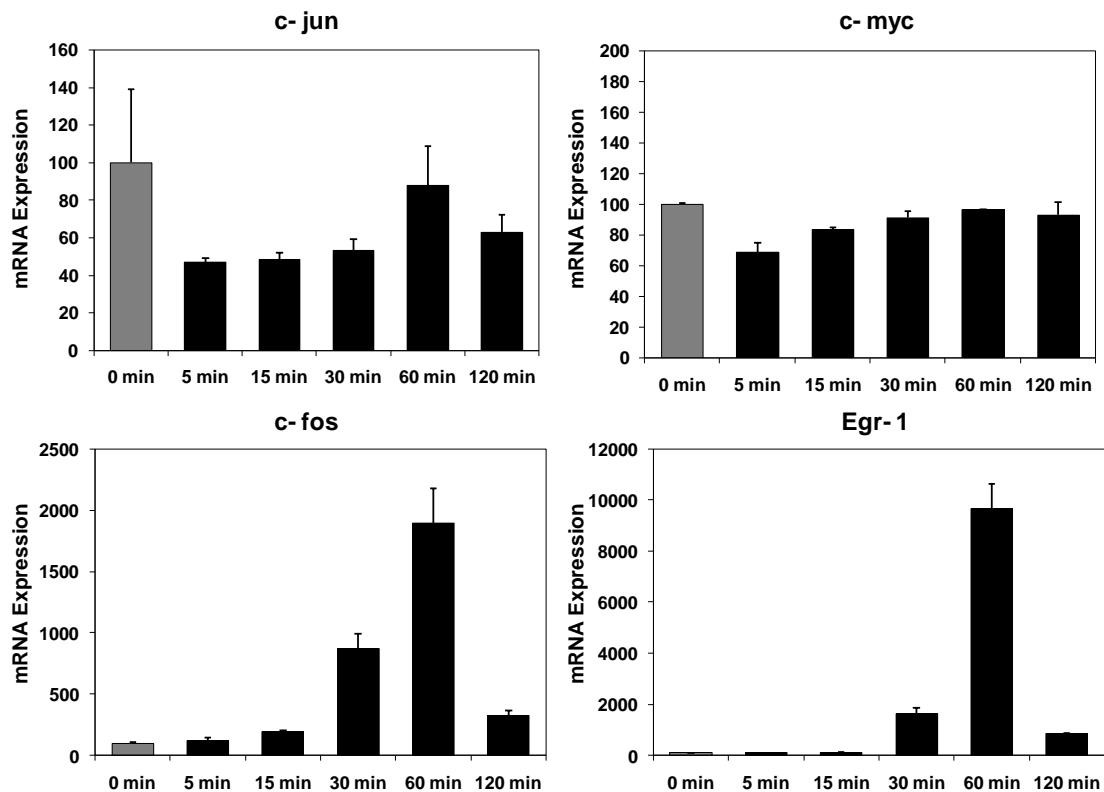


Abb. 15: „Real- Time- PCR“ zur Serum- regulierten „Immediate early“- Gen- Induktion im 8988t- Zellsystem

Eine deutliche Induzierbarkeit lässt sich für die Expression von c- fos und Egr- 1 erkennen, wobei die maximale Induktion nach 60 Minuten erreicht wird. Mit einem fehlenden Anstieg in ihrer mRNA-Expressionsrate präsentieren sich c- jun und c- myc. Als Ladekontrolle wurde die Expression von XS 13 gemessen.

In der Untersuchung nach der Induzierbarkeit der „Immediate early“- Gene durch Serum lassen sich in den Zelllinien 8988t und Panc- 1 unterschiedliche Resultate erkennen. Während in beiden Zelllinien eine Induzierbarkeit durch Serumstimulation mit einem Maximum nach 30 beziehungsweise 60 Minuten für c- fos und Egr- 1 zu verzeichnen ist, differieren die Ergebnisse zwischen den Zelllinien für die Gene von c- jun und c- myc. So kann ebenfalls in Panc- 1- Zellen von einer sichtbaren Induktion von c- jun nach 60 Minuten gesprochen werden, während sich in diesem Fall in der Zelllinie 8988t eine Induktion durch Serum nicht registrieren lässt. Ein ebenfalls unterschiedliches Bild ergibt sich in der Untersuchung des Gens von c- myc. Hier kommt es in den Panc- 1- Zellen weniger zu einem plötzlichen Anstieg der

Expressionsrate, als vielmehr zu einem stetigen Anstieg bis zum Maximum bei 120 Minuten. Im Gegensatz hierzu ist in der Zelllinie 8988t keine Steigerung der Expressionsrate zu verzeichnen, was sich durch ihre bekannte c- myc- Amplifikation erklären lässt.

3.1.3.2. Untersuchungen zur Regulierbarkeit von „Immediate early“- Genen unter Serumeinfluss auf Protein- Ebene

Ergänzend zu den vorausgehenden Ergebnissen wurden im Folgenden unter den oben genannten Voraussetzungen zeitkinetische Arbeiten zur Induzierbarkeit der „Immediate early“- Transkriptionsfaktoren auf Proteinebene durchgeführt. Zum Einsatz kamen hierbei Gesamtzelllysate der Zelllinien 8988t und Panc- 1.

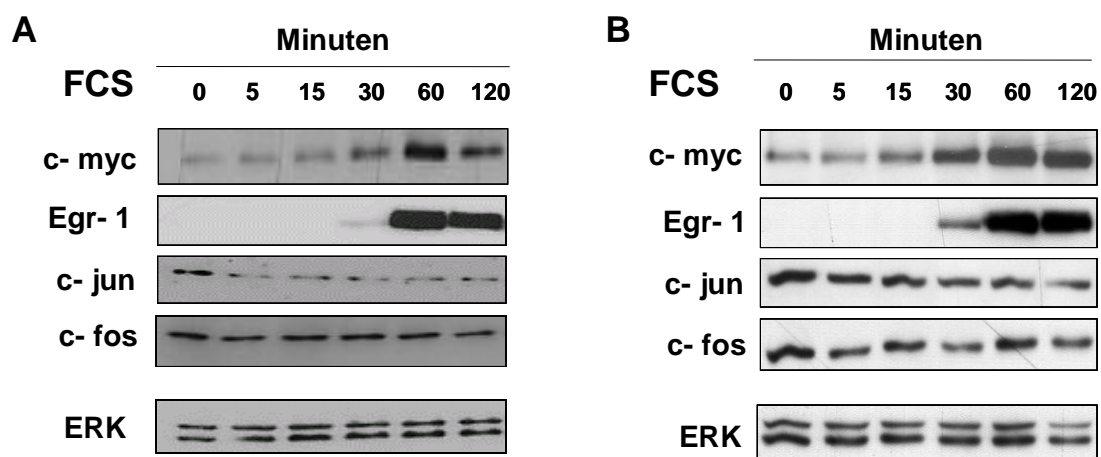


Abb. 16: Western- Blot- Analyse zur Überprüfung der Induzierbarkeit von ausgewählten IEG- Proteinen durch den Einfluss von Serum

Den hier durchgeführten Immunoblots der Zelllinien 8988t (A) und Panc- 1 (B) lagen dieselben Konditionen zu Grunde, wie in den vorausgehenden PCR- Analysen zur Untersuchung der Serum- regulierten Induktion von IEG- Proteinen.

Es zeigt sich eine auf den Stimulationsreiz Serum abhängige Induktion der „Immediate early“- Gene c- myc und Egr- 1. C- jun und c- fos bleiben von der Behandlung unbeeinflusst und weisen ein gleichmäßiges Expressionsmuster auf.

Als Ladungskontrolle dieser Versuchsreihen konnte die Expression der Kinase ERK angenommen werden, da diese konstant und nicht durch Serum beeinflussbar ist.

Auf Proteinebene findet sich in beiden Zelllinien eine deutliche Steigerung der Expression für c- myc und Egr- 1, wohingegen c- jun und c- fos, zusammengefasst als AP- 1, über den gesamten Zeitraum der Serumstimulation eine nahezu konstante Expressionsrate aufweisen. Betrachtet man c- myc so lässt sich erkennen, dass in beiden Zellreihen die Proteinexpression ab ungefähr 30 Minuten Serumstimulation zunimmt. In Panc- 1- Zellen bleibt diese Induktion bestehen, während sich in 8988t- Zellen ein Maximum bei 60 Minuten verzeichnen lässt. Für Egr- 1 gleicht sich das Induktionsmuster beider Zellreihen. Nachdem es die ersten 30 Minuten nicht erfassbar exprimiert wird, kann nach diesem Zeitraum eine leichte Expression erfasst werden, die sich zum Zeitpunkt 60 Minuten auf ein Vielfaches steigert und im weiteren Verlauf dieses Niveau beibehält.

Zusammenfassend ließ sich auf Grund der durchgeführten mRNA- und Proteinanalysen festhalten, dass sich auf beiden Ebenen eine Induktion der „Immediate early“- Gene unter dem Einfluss von Serum beschreiben lässt, wenn auch nicht für jedes der gewählten IEG- Proteine und in beiden Zellreihen gleichermaßen.

So fokusierte sich folgende Arbeiten vor allem auf die mitogenen Transkriptionsfaktoren c- myc und Egr- 1, da nur diese beiden Transkriptionsfaktoren durch Serum auch auf Proteinebene stimulierbar waren.

3.1.4. Funktionelle Auswirkungen der Serum- veranlassten Induktion von „Immediate early“- Genen auf die Zellproliferation

Die Bedeutung der „Immediate early“- Transkriptionsfaktoren in der Serum-induzierten Zellproliferation sollte nach transientem „Knock- down“ mittels Transfektion spezifischer siRNA (small- interferenz- RNA) gegen c- myc beziehungsweise Egr- 1 untersucht werden.

Ergänzend zu den funktionellen Ergebnissen des Thymidin- Assays wurden Daten desselben Ansatzes auf Proteinebene erhoben um nötige Kontrollen für den Assay und die Funktionskraft der eingesetzten siRNA darzustellen.

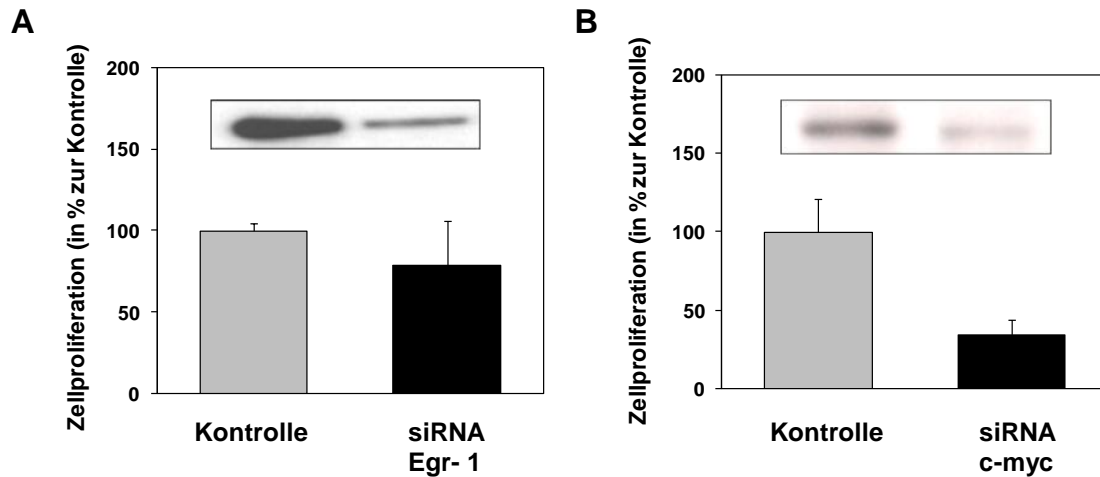


Abb. 17: Zellproliferationsanalyse mittels Thymidin- Assay ausgewählter „Immediate early“- Gene (Egr- 1 (A) und c- myc (B)) ergänzt durch Western- Blot- Analysen

Panc- 1- Zellen wurden durch Einbau des Isotops $[H^3]$ - Thymidin in ihrem Proliferationsverhalten nach Suppression der IEG- Proteine Egr- 1 (A) beziehungsweise c- myc (B) untersucht. Jeder Versuchsteil wurde mit einem eigenen Kontrollansatz ins Verhältnis gestellt, dessen Aktivität gleich 100 % gesetzt wurde. Als Kontrolle wurde hier ein Ansatz gewertet, der unter denselben Konditionen wie die Proben behandelt wurde, aber an Stelle einer effektiven siRNA mit einer ziellosen negativ Kontroll- siRNA transfiziert wurde.

Im Vergleich zu ihren Kontrollen wird eine Reduktion der Proliferationsrate unter dem Einfluss von siRNA gegen die entsprechenden IEG- Proteine erkennbar. Vor allem unter Einsatz von siRNA gegen c- myc lassen sich deutliche Effekte beobachten.

Nach transienter Repression der endogenen c- myc Expression kommt es zu einer eindeutigen Reduktion der Proliferationsrate. In Zahlen ausgedrückt bedeutet das für die Zellpopulation, die unter dem Verlust von c- myc leidet, eine Verminderung um mehr als 60 % der Zellzahl im Vergleich zu ihrer Kontrolle. Unter dem Einsatz von siRNA gegen Egr- 1 nimmt die Zellpopulation um ca. 20 % ab.

Nach Auswertung dieser Proliferationsversuche wird erkennbar, dass insbesondere die Induktion von c- myc von Bedeutung für die Stimulation des Zellwachstums in den untersuchten Pankreaskarzinomzellen ist. Aus diesem Grund sollte sich in weiterführenden Arbeiten vor allem auf c- myc als Vertreter der „Immediate early“- Gene konzentriert werden.

3.2. Signalkaskaden zur Serum- abhängigen Wachstumsregulation im Pankreaskarzinom unter Einfluss des „Immediate early“- Gens c- myc

Das Wachstumsverhalten von Zellen wird von diversen Signalkaskaden reguliert. Im Fokus dieser Arbeit sollte das Serum- induzierte Wachstumsverhalten unter dem Einfluss von c- myc stehen. Zu den bekanntesten mitogenen Signalwegen, die in der Literatur mit der Induktion durch Serum benannt werden, zählen die Ras- abhängige Ras- Raf- MEK- ERK- Kaskade und der Ras- unabhängige Calcium-/ Calcineurin- Signalweg (Roux und Blenis 2004; Baksh et al. 2000; Lipskaia und Lompré 2004).

Zur Verifizierung der Bedeutung dieser Regulationsmechanismen wurden Western- Blot- Analysen erstellt. Unter Verwendung von Gesamtzelllysaten und nukleären Proteinfractionen der Zelllinie 8988t wurden diese in einer zeitkinetischen Auftragung über 24 Stunden mit Serum (10 % FCS) stimuliert. In einem zweiten ergänzenden Versuchsansatz wurden Zellen in gleicher Weise mit Serum stimuliert. Zusätzlich erfuhren diese Proben eine Behandlung mit den Inhibitoren U0126 (0,5 μ mol) beziehungsweise Cyclosporin A (CsA, 1 μ M), die als spezifische Modulatoren der zu untersuchenden Kaskaden gelten. U0126 wirkt unter allosterischer Bindung an MEK und hemmt somit spezifisch ERK in seiner Aktivität, da ERK das einzig bekannte Substrat von MEK darstellt (Roberts und Der 2007; McCubrey et al. 2006). CsA beeinflusst Calcineurin, indem es irreversibel an die katalytische Domäne der Phosphatase bindet. Zur besseren Darstellung der Serumeffekte wurden die Zellen vor Versuchsbeginn für 24 Stunden unter Serumentzug gesetzt.

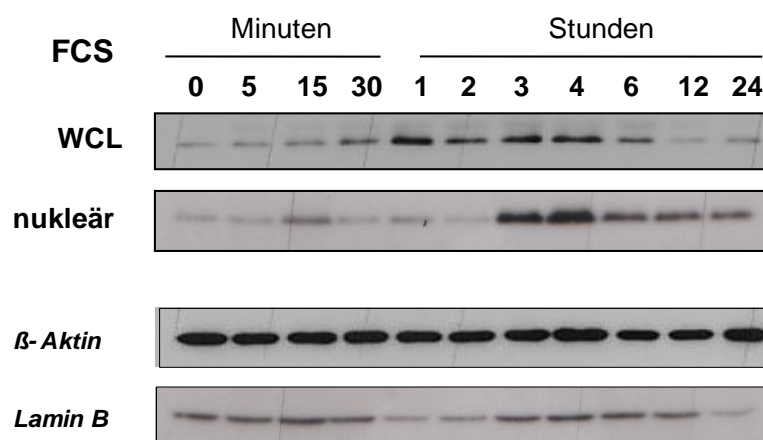


Abb. 18: Western- Blot- Analyse zur Induzierbarkeit von c- myc unter Einfluss von Serum über die Zeit in der Pankreaskarzinomzelllinie 8988t

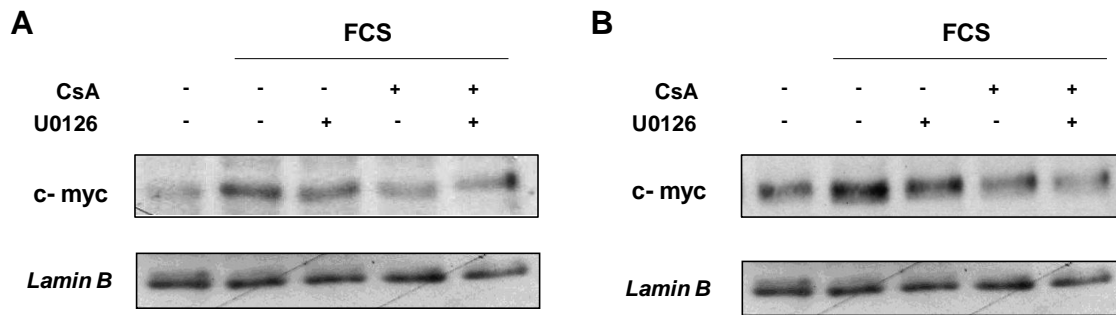


Abb. 19: Western- Blot- Analyse zur Überprüfung des Einflusses der Ras-/ ERK- und Calcium-/ Calcineurin- Kaskade auf die nukleäre Expression von c- myc in Panc- 1 (A) und 8988t (B)

Die Immunoblot- Analysen zeigen Serum stimulierte Gesamtzelllysate und nukleäre Proteinfractionen der Pankreaskarzinomzelllinie Panc- 1 bzw. 8988t, aufgetragen auf ein 10 %iges SDS- Polyacrylamidgel, zum Nachweis des „Immediate early“- Transkriptionsfaktors c- myc mittels seines entsprechenden Antikörpers im ECL- System.

Im zeitlichen Verlauf lässt sich eine eindeutige Serum- abhängige (10 % FCS) Induktion der c- myc- Expression erkennen, die sich durch den Einsatz des Calcium-/Calcineurin- Kaskaden- Inhibitors CsA (1 μ M) antagonisieren lässt und scheinbar unbeeinflusst durch die Behandlung mit U0126 (0,5 μ mol) bleibt.

Als Ladungskontrolle für die Gesamtzelllysate diente der Nachweis von β - Aktin, für die Lysate aus nukleären Proteinen wurde ein Antikörper gegen Lamin eingesetzt.

Unter Serum- Behandlung lässt sich die Expression des „Immediate early“- Transkriptionsfaktors c- myc induzieren. So kann in reproduzierbarer Weise nach einer Stunde im Gesamtzelllysate (siehe Abb. 16) und zeitlich versetzt nach drei Stunden in der isoliert nukleären Proteinfraction eine deutlich vermehrte Expression von c- myc erkennbar gemacht werden. In beiden Proteinlysaten reduziert sich dieser Effekt nach vier Stunden Stimulation. Im weiteren zeitlichen Verlauf verliert Serum an Induktionskraft, so dass im Gesamtzelllysate nach 12 Stunden kaum noch Protein erfassbar ist. In den nukleären Lysaten bleibt nach einem verstärkten Expressionsplateau zwischen den Zeiten drei und vier Stunden Serumstimulation bis zum Ende der Versuchsreihe eine leicht erhöhte Expression detektierbar.

Unter Einsatz von CsA, als Inhibitor der Phosphatase Calcineurin, bleibt der gesteigerte Induktionseffekt von Serum auf c- myc aus, wohingegen unter Behandlung mit dem

indirekten ERK- Inhibitor U0126 kein suppressiver Effekt verbucht werden kann. Die Versuche wurden in zwei verschiedenen Zelllinien durchgeführt (Panc- 1 und 8988t). Die Ergebnisse sind in beiden Zelllinien deckungsgleich.

Es scheint also, dass die Serum- induzierte Expression von c-myc vor allem über den Calcineurin- Signalweg und weniger über die Ras- Raf- MEK- ERK- Signalkaskade reguliert wird. Schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen sollte sich im weiteren Verlauf auf die Calcineurin- Aktivierung konzentriert und dieser Signalweg genauer erörtert werden.

3.2.1. Der Einfluss von Serum auf die Aktivität der Calcium- abhängigen Phosphatase Calcineurin

Nachdem die einflussreiche Rolle von Calcineurin in der Induktion von c- myc gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden diese Serin/ Threonin- Phosphatase genauer in ihrem spezifischen Stimulationscharakter überprüft werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde sich eines speziellen Kits, zur Ermittlung der Phosphatase- Aktivität von Calcineurin, bedient. Die Versuchsauswertung beruhte in einer photometrischen Messung der Extinktion eines freien Phosphatrests, der von einem synthetisch hergestellten Phosphopeptidsubstrat durch die Calcineurin- Phosphatase abgespalten wird.

Die Versuchskonditionen entsprachen einem zeitkinetischen Aufbau, der die Serum- Stimulationseffekte auf die Aktivität der Phosphatase Calcineurin darstellt. Analog zu den vorherigen Stimulationsreihen mit Serum, wurde auch in diesem Ansatz den Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie 8988t vor Versuchsbeginn über einen Zeitraum von 24 Stunden Serum entzogen.

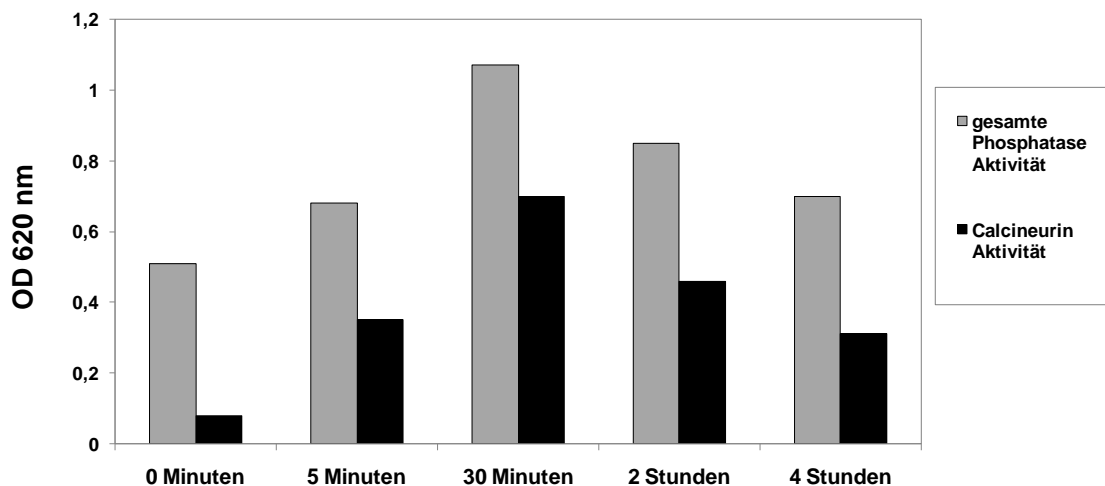


Abb. 20: Calcineurin- Assay zur Bestimmung der Phosphatasen- Aktivität unter dem Einfluss von Serum

In den Zellen der Zelllinie 8988t wurde mit Hilfe des Umsatzes eines artifiziell hinzugefügten Phosphopeptidsubstrats für Calcineurin die Aktivität dieser Phosphatase gemessen. Die Ansätze wurden nach 24 Stunden Serumentzug nach dem Muster einer Zeitkinetik über vier Stunden mit 10 % FCS behandelt.

Es wird deutlich, dass mit steigender Stimulationsdauer unter Serum die Aktivität der Phosphatase Calcineurin entsprechend zunimmt, wobei sich nach 30 Minuten ein Maximum ausbildet.

Die Aktivität von Calcineurin wurde ins Verhältnis zur gesamten Phosphatase- Aktivität gesetzt.

Unter Einsatz von Serum über eine Zeitspanne von vier Stunden wird der Einfluss auf die Aktivität der Phosphatase Calcineurin erkennbar. So lässt sich nach 30 Minuten Stimulation unter kontinuierlicher Aktivitätszunahme das Aktivitätsmaximum von Calcineurin verzeichnen (mehr als achtfacher Anstieg). Bis zum letzten Messzeitpunkt nimmt die Phosphatase- Aktivität stetig wieder ab, jedoch verbleibt auch nach vier Stunden Serum- Stimulation noch eine Steigerung um nahezu das Vierfache der Ausgangsaktivität.

3.2.2. Der Einfluss von Serum auf Calcium als primärer Botenstoff („first messenger“)

Um die Calcium- Abhängigkeit, der in den Mittelpunkt dieser Arbeit gestellten Calcineurin- Kaskade zu erörtern, wurden, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gudermann aus dem pharmakologischen Institut Marburg, Untersuchungen zum intrazellulären Calcium- Influx, als Antwort auf einen Serum- Stimulationsreiz, aufgestellt.

In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass es unter Stimulation mit Serum zu einer massiven Zunahme der intrazellulären Calcium- Konzentration kommt. Ferner konnte die AG von Prof. Gudermann zeigen, dass die Zunahme der intrazellulären Calcium Konzentration primär aus einer gesteigerten Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum und weniger durch einen erhöhten extrazellulären Ioneneinstrom resultiert.

Im Kontext zu der Thematik dieser Arbeit konnte dadurch eine Kaskade zwischen Serum, Calcium und Calcineurin formuliert werden, die sich auf zuvor erarbeitete Ergebnisse mit Serum als Stimulationsreiz und Angaben aus der Literatur stützt, wenn hier Calcineurin als eine Calcium- abhängige Phosphatase beschrieben wird (Stewart et al. 1982; Rao et al. 1997).

3.3. Transkriptionelle Ereignisse in der Calcineurin- abhängigen Induktion des „Immediate early“- Gens c- myc

Zusammenfassend kann, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen, festgehalten werden, dass c- myc, als Mitglied mitogener „Immediate early“- Gene, Serum- abhängig und unter Kontrolle der Calcium- regulierten Phosphatase Calcineurin in der Lage ist, Wachstum im Zellsystem des Pankreaskarzinoms zu regulieren.

Im folgenden Abschnitt sollte dieser Sachverhalt der transkriptionellen Induktion des „Immediate early“- Gens c- myc unter Regulation von Calcineurin genauer erörtert werden.

Im Zentrum der Untersuchungen stand der Calcineurin- regulierte Transkriptionsfaktor NFAT („nuclear factor of activated T- cells“), der für seine Calcineurin- abhängige Wachstumsregulation in malignen Zellsystemen bekannt ist. Der Einfluss von Serum

auf NFAT sollte im Folgenden mittels verschiedener Techniken genauer betrachtet werden.

3.3.1. Untersuchungen zur Serum- Stimulierbarkeit des Transkriptionsfaktors NFAT

3.3.1.1. Fluoreszenz- mikroskopische Untersuchungen von NFAT nach Serumbehandlung

In ersten Untersuchungen zur genaueren Beschreibung des Einflusses von Serum auf den Transkriptionsfaktor NFAT wurde eine Fluoreszenz- mikroskopische Darstellung von NFAT unter Stimulation mit FCS (10 %) erstellt. Die Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie 8988t wurden in zwei Kohorten unterteilt und auf Deckgläsern ausgesät. Es entstand eine unter serumfreien Bedingungen gehaltene Zellgruppe und eine mit 10 % FCS über einen Zeitraum von 60 Minuten stimulierte Zellpopulation. Voraussetzung zur Versuchsauswertung war eine Fixation der Zellen mit Paraformaldehyd nach Abschluss der Zellbehandlung. Zur Darstellung von endogenem NFATc2 unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Proben mit dem Fluoreszenzfarbstoff „Alexa Rot“ behandelt. Um die Morphologie des Zellkerns darzustellen und somit eine objektive Differenzierung zwischen Cytoplasma und Zellkern zu erlangen, wurden AT- reiche Regionen der DNA mit DAPI (4',6'-Diamidino- 2- Phenylindolhydrochlorid) angefärbt. Letztendlich bestätigte die Überlagerung der DAPI- Zellkern- Färbung mit der Nachweisfärbung gegen endogenes NFATc2 die Lokalisation des Transkriptionsfaktors NFATc2 im Cytoplasma bzw. im Zellkern.

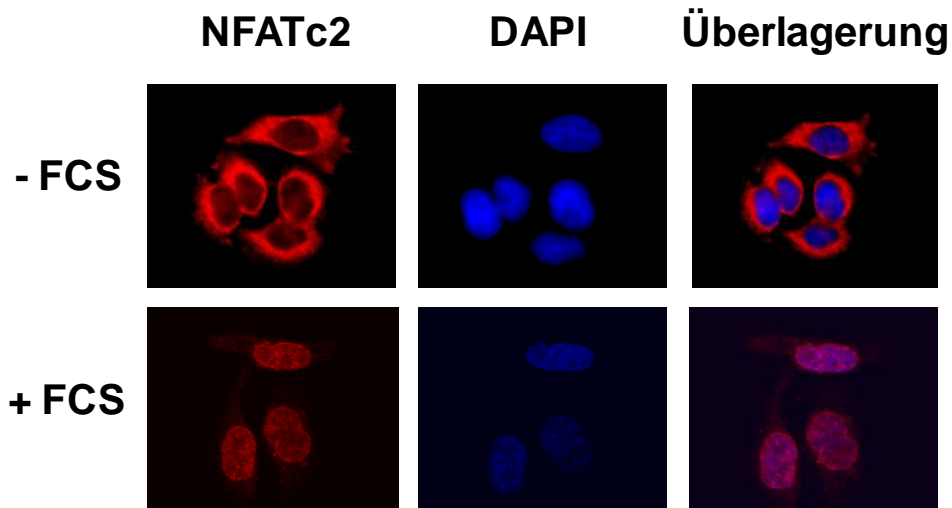


Abb. 21: Immunfluoreszenz- mikroskopische Darstellung der endogenen NFAT- Lokalisation unter dem Einfluss von Serum

Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie 8988t wurden auf Deckgläsern ausgesät, je nach Gruppenzugehörigkeit mit 10 % FCS über 60 Minuten stimuliert oder lediglich in serumfreien DMEM gehalten, mit einem Antikörper gegen NFATc2 behandelt und anschließend mit Paraformaldehyd fixiert. Zur Visualisierung von NFATc2 und der Zellkerne kam „Alexa Rot“ bzw. DAPI zum Einsatz. Die Bilder wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops aufgenommen.

Es wird erkennbar, dass die Behandlung mit Serum eine Translokation von NFATc2 aus dem Cytoplasma in den Zellkern nach sich zieht.

In der Fluoreszenz- mikroskopischen Auswertung zur NFATc2- Lokalisation nach Serumstimulation mit 10 % FCS über einen Zeitraum von 60 Minuten wird eine Translokation von endogenem NFATc2 aus dem Cytoplasma in den Zellkern erkennbar. Unter indirektem Nachweis mittels eines rot fluoreszierenden Farbstoffes („Alexa Rot“), der sich gekoppelt an einen sekundären Antikörper gegen NFATc2 befindet, wird erkennbar, dass endogenes NFATc2 in der Kohorte der unbehandelten serumfrei gehaltenen Zellen nahezu ausschließliche im Cytoplasma detektierbar ist, während NFATc2 in der mit FCS stimulierten Zellpopulation kaum noch im Cytoplasma, sondern vor allem im Zellkern vorliegt.

3.3.1.2. Untersuchungen von NFAT auf Proteinebene nach Serumbehandlung

Im Folgenden sollten die Fluoreszenz- mikroskopischen Effekte der NFAT-Translokation in den Nukleus nach Serumstimulation (10 % FCS) auf Proteinebene nachvollzogen werden. Hierfür wurden isolierte Lysate nukleärer und cytoplasmatischer Proteine der Pankreaskarzinomzelllinien IMIM- PC1 und 8988t unter zeitkinetischen Aspekten untersucht und mittels Western- Blot- Technik ausgewertet. Zur optimalen Ausarbeitung der Serumeffekte wurden die Zellen vor Versuchsbeginn über 24 Stunden unter Serumentzug gesetzt.

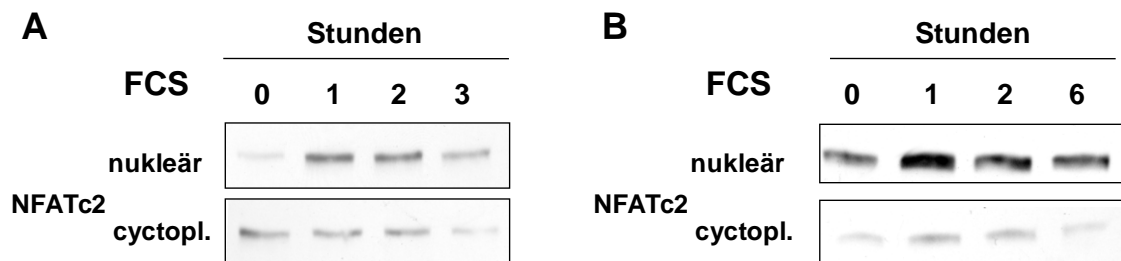


Abb. 22: Western- Blot- Analyse zur Untersuchung des Serumeinflusses auf die intrazelluläre NFATc2- Lokalisation

NFATc2 wurde im IMIM- PC1 (A)- und 8988t (B)- Zellsystem auf nukleärer und cytoplasmatischer Ebene auf seine Expressionsrate unter Stimulation von FCS (10 %) untersucht. Den Zellen wurde für 24 Stunden Serum entzogen und anschließend über eine Dauer von drei (A) bzw. sechs (B) Stunden mit FCS behandelt.

Sowohl für die Zellen der Linie IMIM- PC1, als auch 8988t, zeigt sich eine Zunahme des nukleären Proteinanteils binnen der ersten Stunde nach FCS- Stimulation. Analog hierzu zeigt sich in den cytoplasmatischen Fraktionen keine Steigerung der Proteinexpression über die Zeit.

Unter Serumstimulation wird eine Zunahme der nukleären NFATc2- Fraktion in beiden Zelllinien sichtbar. In Analogie hierzu bleibt die Expressionsrate der cytoplasmatischen Proteinproben konstant beziehungsweise nimmt leicht ab. Während sich also zum Zeitpunkt des Serumentzugs („0 Minuten“) in beiden Versuchsreihen lediglich eine schwache Expression von NFATc2 auf nukleärer Proteinebene verzeichnen lässt, kann zum ersten Messpunkt nach einer Stunde Stimulation eine deutliche Erhöhung der

NFATc2- Expressionsrate registriert werden. In beiden Zelllinien stellt dieser Zeitpunkt das Induktionsmaximum nach FCS- Stimulation dar. In den IMIM- PC1- Zellen bleibt die erhöhte Expression von NFATc2 über zwei Stunden erhalten und nimmt nach ungefähr drei Stunden wieder ab. 8988t- Zellen werden über einen Zeitraum von sechs Stunden mit Serum stimuliert. In ihrer zeitkinetischen Stimulationsreihe lässt sich schon nach der ersten Stunde nach Induktionsmaximum (zwei Stunden Serum- Stimulation) ein Rückgang der nukleären Expressionsleistung erkennen, der sich ebenso im Messpunkt sechs Stunden darstellt. Die Expression von nukleärem NFATc2 zum letzten Messzeitpunkt nach Stimulation liegt jedoch in beiden Versuchsreihen noch höher als der nicht stimulierte Basalwert („0 Minuten“).

Aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, dass es als Antwort auf die Serumstimulation zu einer raschen Aktivierung (innerhalb der ersten Stunde) und Translokation von NFATc2 in den Zellkern kommt.

3.3.1.3. Betrachtung des DNA- Affinitätsverhaltens von NFAT unter dem Einfluss von Serum

Durch Einsatz der Methode eines DNA- Pulldown- Assays kann die physikalische Situation von NFAT an der DNA genauer beleuchtet werden. Im Fokus stand hier die NFAT-/ GGAAA- Oligonukleotid- Konsensussequenz, die in diesem Versuchsansatz durch Einsatz des proximalen Promotorabschnitts des humanen Interleukin- 2- Gens repräsentiert wird. Der Versuchsaufbau umfasste eine zeitkinetische Stimulation der Proben mit Serum (10 % FCS) über einen Zeitraum von 30 Minuten in den Zelllinien 8988t und Panc- 1. Als Versuchsvoraussetzung galt ein serumfreies Intervall von 24 Stunden vor Stimulationsbeginn. Als Kontrollgröße der Serumstimulationseffekte galt eine unter serumfreien Konditionen erstellte Probe. Nach Stimulation wurden nukleäre Zelllysate geerntet, denen willkürlich gewählte Biotin- markierte DNA- Oligonukleotidsequenzen zugeführt wurden. Mit Hilfe von Streptavidin- Agarose- Beads konnten die DNA- Protein- Komplexe präzipitiert und Oligonukleotidsequenz- gebundenes NFAT konnte mittels Western- Blot- Technik nachgewiesen werden.

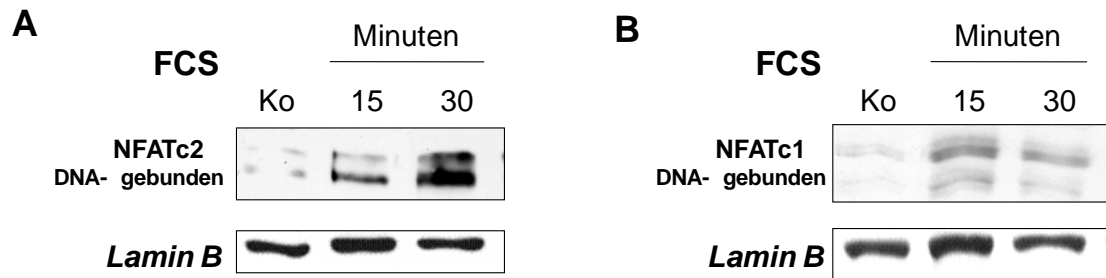


Abb. 23: DNA- Pulldown- Assay zur Untersuchung des Verhaltens des Transkriptionsfaktors NFAT an der spezifischen Konsensusregion GGAAA unter dem Einfluss von Serum

NFATc2 wurde in 8988t (A)- und NFATc1 in Panc-1 (B)- Zellen mittels der Technik eines DNA- Pulldown- Assays in seinem Bindungsverhalten an die perfekte GGAAA-Konsensussequenz untersucht. Hierfür wurden eine Kontrollgruppe, die unbehandelt unter konstantem Serumentzug gehalten wurde, und zwei Gruppen, die mit Serum (10 % FCS) über eine Zeit von 15 bzw. 30 Minuten behandelt wurden, gebildet. In anschließender Immunoblot- Technik wurden Antikörper gegen nukleäres NFATc2 und NFATc1 eingesetzt. Die aufgetragenen nukleären Zelllysate stellen NFATc2 bzw. NFATc1 dar, das an Biotin-markierte DNA- Oligonukleotidsequenzen gebunden ist und mittels Präzipitation mit Streptavidin gewonnen wurde.

Es wird ersichtlich, dass unter Einfluss von Serum NFAT sich in seiner DNA- Bindungsaffinität an die GGAAA- Konsensussequenz steigert.

Der Nachweis von nukleärem Lamin im Zelllysate galt als Kontrolle vor Ansetzen des Pulldown- Experiments.

Im Kern dieses Versuches stand das Bindungsverhalten von NFAT an seine Konsensussequenz GGAAA unter dem Einfluss von 10 % FCS, das mittels der Technik des DNA- Pulldown- Assays bewertet wurde. Als Ergebnis lässt sich in beiden Zelllinien (8988t und Panc- 1) eine Serum- induzierte Zunahme der Bindungsaffinität von NFAT zu seiner GGAAA- Konsensussequenz verzeichnen. Das DNA-Affinitätsmaximum nach FCS- Stimulation variiert dabei leicht zwischen den beiden Zelllinien. So findet sich die höchste DNA- Bindungskraft von NFATc2 in 8988t-Zellen an seine Oligonukleotidsequenz nach 30 Minuten, während NFATc1 im Zellsystem der Panc- 1- Zellen schon nach 15 Minuten Serumstimulation sein Maximum erfährt.

Unter genauerer Betrachtung der Immunoblot Ergebnisse fällt eine Mehrbandigkeit des detektierten NFAT- Proteins auf, welche die verschiedenen Phosphorylierungsstadien widerspiegelt. So lässt sich besonders deutlich in den Proben der Zelllinie 8988t erkennen, dass unter FCS- Behandlung es vor allem zu einer Intensitätssteigerung der unteren Bande und –abnahme der oberen Bande kommt. Die untere Bande entspricht der aktivierten dephosphorylierten Form von NFAT, die aus diesem Grund ein kleineres Molekulargewicht aufweist.

3.3.1.4. Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Signalkaskaden auf den Transkriptionsfaktor NFAT

Desweiteren sollte eine Aussage darüber getroffen werden, welche Signalkaskade die zuvor beschriebenen Effekte über den Transkriptionsfaktor NFAT maßgeblich beeinflusst. Im Fokus standen erneut die Ras- Raf- MEK- ERK- Kaskade (Serfling et al. 2000; Porter et al. 2000) und der Calcium-/ Calcineurin- Signalweg (Roux und Blenis 2004; Baksh et al. 2000; Lipskaia und Lompré 2004; Crabtree 2000; Im, Rao 2004).

Es wurden Versuche auf Proteinebene durchgeführt, die zum Ziel hatten sowohl den Einfluss der Ras-/ ERK- als auch der Calcium-/ Calcineurin- Kaskade auf die Aktivierung von NFAT zu untersuchen. Mit Hilfe von Serum und unter Einsatz von spezifischen Inhibitoren (CsA, 1 μ M und U0126, 0,5 μ M) der beiden Kaskaden sollten ihre Effekte auf die Aktivierung von NFAT beleuchtet werden. U0126 wirkt hierbei unter allosterischer Bindung an MEK und hemmt somit spezifisch ERK in seiner Aktivität, da ERK das einzig bekannte Substrat von MEK darstellt (Roberts und Der 2007; McCubrey et al. 2006). CsA beeinflusst die Calcium-/ Calcineurin- Kaskade, indem es irreversibel an die katalytische Domäne der Phosphatase Calcineurin bindet.

Die Versuchsreihe der nukleären NFAT- Fraktion wurde durch den Nachweis von pERK im Gesamtzelllysate ergänzt, wodurch die Effekte der Inhibitoren auf die Ras-/ ERK- Kaskade visualisiert wurden.

Zur optimalen Ausarbeitung der Serumeffekte wurden die Zellen vor Versuchsbeginn über 24 Stunden unter Serumentzug gesetzt.

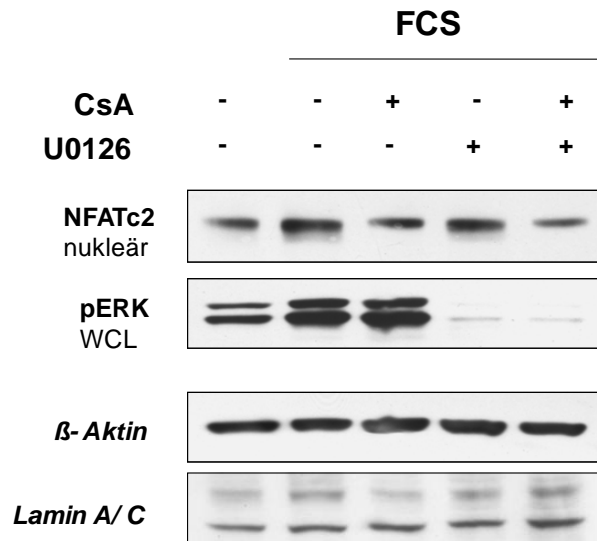


Abb. 24: Western- Blot- Analyse zur Überprüfung des Einflusses der Ras-/ ERK- und Calcium-/ Calcineurin- Kaskade auf die nukleäre Expression des Transkriptionsfaktors NFAT (WCL= whole cell lysat)

8988t Zellen wurden mit Serum und den Inhibitoren CsA (1 μ M) und U0126 (0,5 μ M) behandelt. Als Kontrollzellen dienten Zellen, die in serumfreiem Medium kultiviert wurden. Im Immunoblot wurde die nukleäre Translokation von NFATc2 in Abhängigkeit zur Aktivierung von ERK (pERK) ausgewertet.

Nach Serumbehandlung lässt sich eine Induktion der Expression von nukleärem NFATc2 erkennen. Unter Hemmung der Calcium-/ Calcineurin- Kaskade durch CsA kommt es zu einem merklichen Abfall der nukleären Translokation. Dieser inhibierende Effekt kann durch eine U0126- vermittelte Hemmung von ERK nicht erzielt werden. Gleichwohl die Kontrollbanden der pERK- Expression eine erfolgreiche Wirkung des Inhibitors bestätigen. Der kombinierte Einsatz beider Inhibitoren führt nicht zu einer zusätzlichen Hemmung von NFATc2.

Als Ladungskontrolle der Western- Blot- Analysen diente der Nachweis des nukleären Proteins Lamin bzw. β - Aktin für die Gesamtzelllysate von pERK.

Unter Verwendung der spezifischen Kaskadeninhibitoren CsA und U0126 sollte der Einfluss der entsprechenden Signalwege auf die nukleäre NFATc2- Expression überprüft werden. Es zeigt sich, dass die induzierenden Effekte von Serum auf NFATc2 durch CsA antagonisierbar sind, während U0126 keinen Einfluss auf die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors zu haben scheint. Gleichwohl die

Kontrollbanden der pERK- Expression eine erfolgreiche Wirkung des Inhibitors bestätigen. Eine kombinierte Gabe beider Inhibitoren führt nicht zu einer zusätzlichen Hemmung von NFATc2.

Schlussfolgernd aus dieser Versuchsreihe konnte also angenommen werden, dass weniger die Ras- abhängige ERK- Kaskade, als viel mehr Calcium- vermitteltes Calcineurin für die nukleäre Translokation von NFAT eine Rolle spielt. Diese Ergebnisse stehen in Analogie zu den zuvor erhaltenen Ergebnissen zur Regulation der c- myc- Induktion, die auch über den Signalweg von Calcineurin zu verlaufen scheinen (Abb. 19). Bevor jedoch der Hypothese einer NFAT- vermittelten c- myc- Induktion unter dem Einfluss von Calcium- Calcineurin genauer nachgegangen wurde, sollte zuvor das Verhalten von NFAT an seiner DNA- Konsensussequenz genauer betrachtet werden.

3.4. Promotoranalysen unter der Stimulation mit Serum

3.4.1. Untersuchungen zum Verhalten von NFAT an seiner DNA- Konsensussequenz unter Stimulation mit Serum

Zur genaueren Verifizierung der Annahme, dass NFAT seine DNA- Affinität durch den Einfluss von Serum steigert, sollten an dieser Stelle quantitative Promotor- Analysen an der NFAT- Zielsequenz, mit Hilfe eines NFAT responsiven Promotors (cis- NFAT), durchgeführt werden.

Hierfür wurden Luziferase Reporter Gen Assays unter der Verwendung der perfekten NFAT- Konsensussequenz GGAAA im cis- NFAT- Konstrukt angefertigt. Cis- NFAT stellt ein artifizielles Promotor- Konstrukt dar, das lediglich drei hintereinandergeschaltete NFAT-/ GGAAA- Bindungsstellen aufweist. Um den Einfluss von Serum genauer zu erarbeiten, sollte die Induktion der Promotoraktivität des responsiven NFAT- Promotors, cis- NFAT, unter Serumbehandlung bestimmt werden. Hierfür wurde eine Stimulationsreihe in der Pankreaskarzinomzelllinie 8988t mit Serum über einen Zeitraum von 24 Stunden angefertigt. Neben dem Luziferase-Promotorkonstrukt cis- NFAT wurden NFATc1- und NFATc2- Effektorplasmide, deren Genprodukte in ihrer Interaktion mit der Promotor- Sequenz überprüft werden sollten,

transient in die Zellen transfiziert. Zur optimalen Ausarbeitung der Serumeffekte wurden die Zellen vor Versuchsbeginn für 24 Stunden unter Serumentzug gesetzt.

Die Auswertung erfolgte unter Ernten von Gesamtzelllysaten und indirekter Bestimmung der cis- NFAT- Promotoraktivität mittels Luziferase- Aktivitätsmessung im Luminometer. Die Lichtemission steht hierbei proportional zur Luziferase- Aktivität. Sie stellt also eine Größe der zu untersuchenden vorgeschalteten Promotor- Aktivität dar.

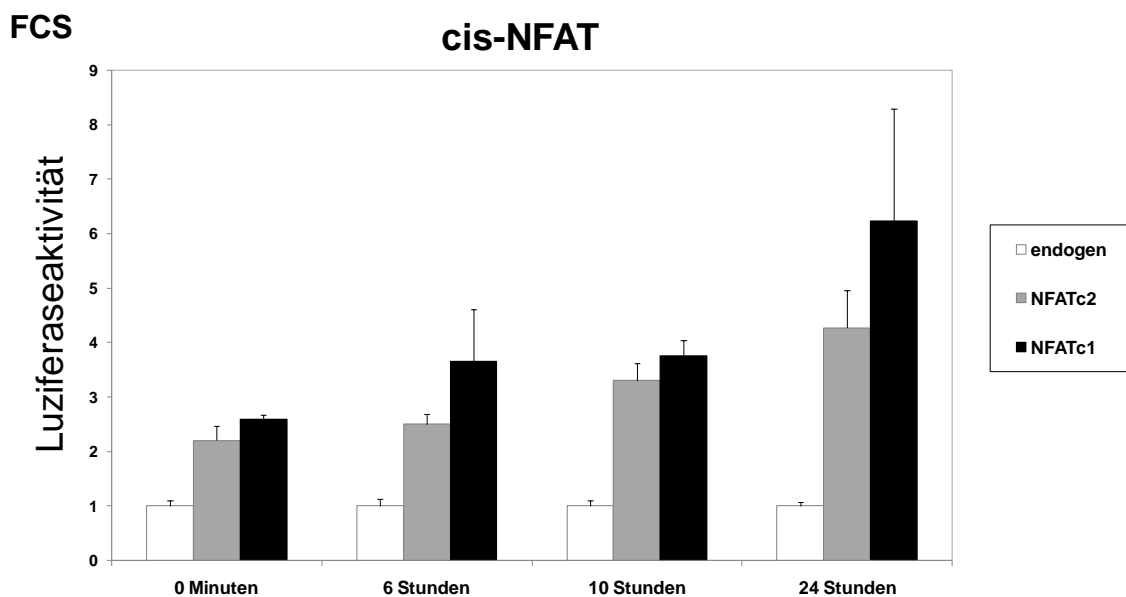


Abb. 25: NFAT- Promotoraktivitäts- Analysen mittels Luziferase Reporter Gen Assay unter dem Einfluss von Serum

Die Zelllinie 8988t wurde mit einem cis- NFAT- Luziferasekonstrukt und den Effektorplasmiden NFATc1 und NFATc2 transient transfiziert. Die Ansätze wurden nach 24 Stunden Serumentzug nach dem Muster einer Zeitkinetik über 24 Stunden mit 10 % FCS behandelt.

Es wird deutlich, dass mit steigender Stimulationsdauer unter Serum, die Promotoraktivität des cis- NFAT- Konstrukts entsprechend zunimmt.

Die endogene Aktivität des cis- NFAT- Vektors wird in seiner basalen Aktivität gleich eins gesetzt und dient als Bezugsgröße.

Die Verwendung von Serum unterschiedlicher Dauer spiegelt sich in einer veränderten Aktivität des cis- NFAT- Promotors wider. So konnte verhältnismäßig zur

Serumstimulationsdauer eine Induktion der Promotoraktivität gezeigt werden. Während zu Beginn der Stimulationsreihe unter serumfreien Voraussetzungen die Ko-Transfektion von NFAT- Effektorplasmiden zu einer zweifachen Aktivitätssteigerung des cis- NFAT- Promotors führt, lässt sich dieser Effekt nach 24 Stunden Serumbehandlung auf ein vierfaches unter Ko- Transfektion von NFATc2 und auf ein sechsfaches unter NFATc1 steigern. Die Stimulation über sechs bzw. zehn Stunden bringt unter Einsatz des NFATc2- Effektorplasmids eine Steigerung um das zweieinhalbfache bzw. dreifache mit sich. Unter Verwendung des NFATc1- Konstrukts lässt sich zu beiden Stimulationszeitpunkten (sechs und zehn Stunden) eine dreieinhalbfach höhere Promotoraktivität, im Vergleich zur endogenen Bezugsaktivität, verbuchen.

Zusammenfassend ließ sich nach den auf verschiedensten Ebenen durchgeführten Versuchen zur Fragestellung nach der Serum- Stimulierbarkeit des Transkriptionsfaktors NFAT die Aussage treffen, dass NFAT durch Serum maßgeblich in seinem Verhalten beeinflusst wird. So konnte mittels Immunfluoreszenz-mikroskopischer Darstellung und ergänzend auf Proteinebene gezeigt werden, dass der Einsatz von Serum zu einer Translokation von NFAT in den Nukleus führt (Abb. 21 und Abb. 22). Weiterführende Untersuchungen konnten darlegen, dass als Antwort auf einen Serumstimulus NFAT seine DNA- Bindungsaffinität an die spezifische GGAAA-Konsensussequenz erhöht (Abb. 23). Anschließend Versuche zur Untersuchung des Verhaltens von NFAT an seiner DNA- Konsensussequenz unter Stimulation mit Serum wurden mittels eines NFAT responsiven Promotorkonstruktes (cis- NFAT) angefertigt, wobei sich eine Zunahme der Promotoraktivität unter dem Einfluss von FCS erkennen ließ (Abb. 25).

In weiterführenden Versuchen sollte die Rolle von NFAT in der Serum- induzierten Regulation des c- myc Promoters verifiziert werden.

3.4.2. Strukturuntersuchungen des c- myc- Promotors unter dem Aspekt der Serum- Induzierbarkeit

Zunächst wurden Deletionskonstrukte des c- myc Promotors eingesetzt um die Serum-responsive Promotorregion zu identifizieren. Die Deletionskonstrukte wurden in Zellen der Linie Panc- 1 transient transfiziert und anschließend mit Serum (10 % FCS)

stimuliert. Jedem Transfektionsansatz wurde eine nicht stimulierte, aber transfizierte Kontrolle zur Seite gestellt.

Eine schematische Darstellung der Deletionskonstrukte, die verwendet wurden, findet sich in Abbildung 26 (B).

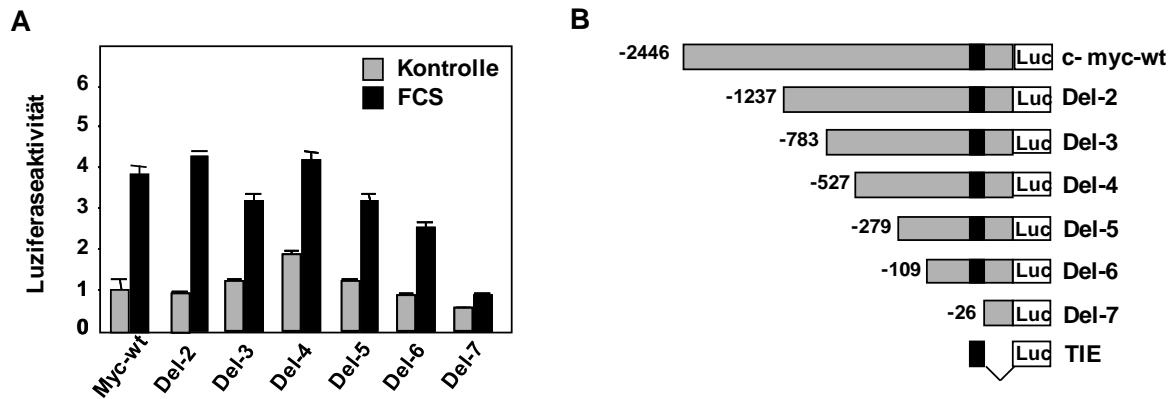


Abb. 26: Luciferase Reporter Gen Assay zur funktionellen Strukturuntersuchung des c- myc- Promotors unter Serumeinfluss

Jeweils ein Paar an Kontroll- und FCS- stimulierten Panc- 1- Zellen wurde mit demselben c- myc- Promotorkonstrukt transient transfiziert. Zur Schaffung von optimalen Versuchsbedingungen wurden die Zellen vor Beginn der Stimulation für 24 Stunden serumfrei gesetzt.

Insgesamt kamen neben dem Konstrukt des Gesamtvektors des c- myc- Wildtyps sechs verschiedene Deletionskonstrukte zum Einsatz, die in ihrer Länge kontinuierlich abnehmen bis schließlich nur noch ein Konstrukt von 26 Basenpaaren, von ehemals 2446 Paaren, ohne TIE- Element übrig bleibt.

Im Vergleich der Promotoraktivitäten unter Serumstimulation zu ihren unbehandelten Kontrollen zeigt sich bis zum Deletionskonstrukt „Del 6“ eine zwei- bis vierfache Aktivitätssteigerung des c- myc- Promotors, unabhängig zu seiner verbleibenden Länge. Lediglich für Konstrukt „Del 7“, dessen entscheidender Unterschied in einem Verlust des TIE- Elements liegt, kann keine entsprechende Induktion mittels Serum verbucht werden (A).

Die Aktivität des Gesamtvektors des c- myc- Wildtyps wurde in seiner Aktivität gleich eins gesetzt.

Eine schematische Darstellung der Deletionskonstrukte findet sich in Abbildung (B).

Jeweils paarweise angeordnete Ansätze, die sich durch identisch transfizierte c- myc- Konstrukte auszeichnen, wurden unter dem Einfluss von Serum in ihrer Promotoraktivität miteinander verglichen. Als Standard galt die Seruminduzierbarkeit des c- myc- Wildtypvektors in voller Länge (2446 Basenpaare), bei dem unter Einsatz von Serum eine mehr als dreifache Promotoraktivitätssteigerung zu verzeichnen ist. Analog zu diesem Bild verhalten sich auch die folgenden Deletionskonstrukte. Ausgenommen von diesem Effekt ist Deletionskonstrukt „Del 7“, dessen Promotoraktivität sich nicht signifikant durch Serum steigern lässt. Unter Berücksichtigung des schematischen Promotoraufbaus wird schnell deutlich, dass als entscheidender Unterschied zu allen anderen Konstrukten das TIE- Element („TGF β inhibitory element“), beschrieben durch Kerr et al. 1990, fehlt.

Um die Relevanz der TIE- Region des c- myc- Promotors in Bezug auf die Seruminduzierbarkeit zu überprüfen, wurde zusätzlich zu den verwendeten Deletionskonstrukten, die kontinuierlich in ihrer Länge abnehmen, ein Konstrukt entworfen, das lediglich das TIE- Element neben der Luziferase- Region enthält.

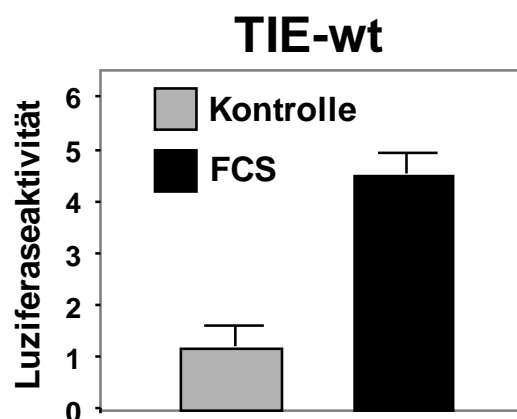


Abb. 27: Luziferase Reporter Gen Assay zur funktionellen Untersuchung des „TGF β inhibitory element“ des c- myc- Promotors

Im Vergleich standen zwei Kohorten Panc- 1- Zellen, die transient mit dem TIE- Element transfiziert sind und sich durch die An- beziehungsweise Abwesenheit von Serum unterschieden. Die Versuchsbedingungen wurden in Analogie zu der Versuchsreihe zuvor gewählt (24 Stunden Serumentzug vor Stimulationsbeginn).

Die Aktivität der unbehandelten Kontrollzellen wurde in ihrer Aktivität gleich eins gesetzt.

Als Ergebnis lässt sich ein mehr als vierfacher Anstieg der Promotoraktivität verzeichnen, wobei der c- myc- Promotor alleine auf das TIE- Element reduziert ist.

Nachdem sich im vorherigen Versuch beobachten ließ, dass alle c- myc-Promotor-Deletionskonstrukte, die eine TIE- Region beinhalten, durch Serum induzierbar sind, jedoch sein Verlust eine Promotoraktivitätszunahme unter Serumeinfluss unterbindet, kam an dieser Stelle ein Konstrukt zum Einsatz, das lediglich dieses Element trägt. Unter Anwendung desselben Versuchsansatzes wie zuvor, bleibt bei alleinigem Vorhandensein des TIE- Elements eine mehr als vierfache Steigerung der Promotoraktivität festzustellen.

Es scheint also, dass für die Seruminduzierbarkeit des c- myc- Promotors lediglich die kurze DNA- Sequenz, das „TGF β inhibitory element“, verantwortlich ist.

3.4.2.1. Die Rolle der Calcium-/ Calcineurin- Kaskade in der c- myc- Induktion über die TIE- Region des- c- myc- Promotors

Im weiteren Verlauf wurde die Bedeutung des Calcium-/ Calcineurin- Signalweges in der Serum- induzierten Stimualtion des c- myc/ TIE- Elementes analysiert.

Hierfür wurde der Basisversuchsaufbau analog zu den vorherigen Luziferase Reporter Assays gewählt. Es entstanden zwei Kohorten an Zellen, die jeweils Zellen mit und ohne Serumeinfluss enthielten, sich allerdings durch die zusätzliche An- bzw. Abwesenheit des Calcineurin- Inhibitors Cyclosporin A (CsA) von einander unterschieden. Die Seruminduktion des unbehandelten Kontrollpaares konnte somit mit der des CsA- behandelten Paares verglichen werden.

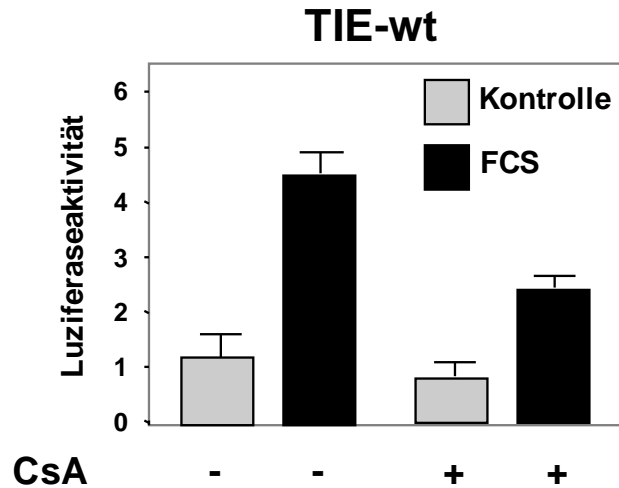


Abb. 28: *Luziferase Reporter Gen Assay zur Untersuchung des Einflusses der Calcium-/ Calcineurin-Kaskade auf die Induktion des „TGF β inhibitory element“ des c- myc- Promotors*

Panc- 1- Zellen wurden mit dem TIE- Element des c- myc- Promotorkonstrukts transient transfiziert und entweder mit Serum stimuliert oder in serumfreiem Medium belassen. Anschließend erfolgte die Behandlung mit oder ohne CsA. Die Grundbedingungen des Versuchsaufbaus wurden in Analogie zu den Versuchsreihen zuvor gewählt (24 Stunden Serumentzug vor Stimulationsbeginn).

Die Aktivität der CsA- unbehandelten serumfreien Kontrollzellen wurde in ihrer Aktivität gleich eins gesetzt.

Es wird erkennbar, dass sich der Einsatz von Cyclosporin A hemmend auf die Induktion des TIE- Elements des c- myc- Promotors auswirkt, was in seiner Konsequenz auch den Induktionsreiz durch Serum unterdrückt.

Nach Auswertung des Luziferase Reporter Assays im Hinblick auf den Einfluss der Phosphatase Calcineurin auf die Serum- abhängige Induktion des TIE- Elements des c- myc- Promotors, lässt sich eine verminderte Promotoraktivität unter Einsatz des Calcineurin- Inhibitors CsA erkennen. Wie in vorangegangenen Versuchen kann auch hier unter Abwesenheit von CsA eine Steigerung der Promotoraktivität, vertreten durch das TIE- Element, registriert werden (viereinhalbfacher Anstieg). Diese Aktivitätssteigerung wird durch das Wirken von Cyclosporin A verhindert, so dass es in CsA- behandelten Proben lediglich zu einer Steigerung der Induktionsrate um das zweieinhalbfache kommt. Im selben Ansatz wird erkennbar, dass die basale Induktion

des c- myc- Promotors ebenfalls vermindert ist (besitzt ungefähr 60 % der Kontrollaktivität der CsA- unbehandelten Zellen).

Die Induktion des TIE- Elements des c- myc- Promotors scheint also maßgeblich von der Calcium- vermittelten Calcineurin- Aktivität abhängig zu sein.

3.4.2.2. Die Rolle von NFAT in der Serum regulierten c- myc- Induktion über die TIE- Region des- c- myc- Promotors

Nachdem die TIE- Region als verantwortlich für die Serum- induzierte Calcium-/ Calcineurin- Kaskaden- abhängige Induktion des c- myc- Promotors identifiziert werden konnte, sollte sich das weitere Vorgehen auf die Frage nach dem Stellenwert von NFAT in diesem transkriptionellen Prozess konzentrieren. Auf verschiedensten Ebenen konnte in vorangehenden Versuchen gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NFAT, ebenso wie c- myc, in Abhängigkeit zu Serum und unter Einfluss der Calcium-/ Calineurin- Kasakade steht. Die folgenden Versuche sollten das Verhältnis von NFAT zur spezifischen TIE- Region im c- myc- Promotor genauer beleuchten.

Zur Erörterung dieser Fragestellung wurden Zellen, die das gesamte TIE- Element exprimieren, einer zweiten Zellpopulation, denen eine NFAT- Bindungsstellen- Mutante transfiziert wurde, in vergleichender Weise gegenüber gestellt. Da der folgende Versuchsansatz im Sinne einer Vertiefung der vorangehenden Promotor- Analysen zu verstehen ist, wurden die vorherrschenden Konditionen dieses Assays in Analogie zu den vorherigen gewählt.

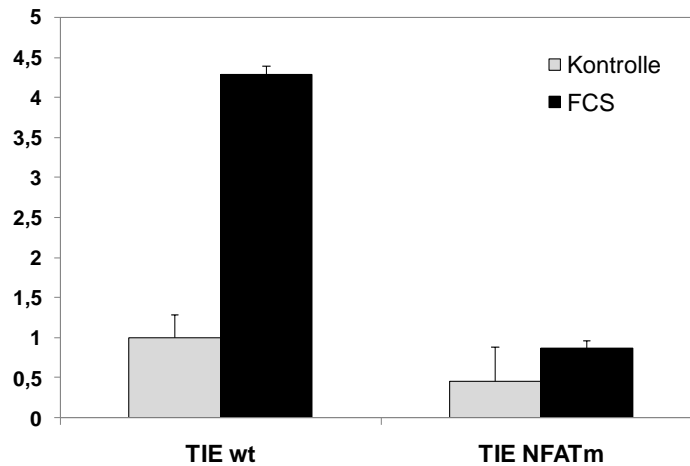


Abb. 29: Luziferase Gen Promotor Assay zur Untersuchung der transkriptionellen Relevanz von NFAT für die Induktion von c- myc über die TIE- Domäne

Im Pankreaskarzinomzellsystem Panc- 1 wurden zwei Gruppen an Serum- stimulierten und nicht stimulierten Zellen gebildet. Die Kohorten unterschieden sich durch ihre transient transfizierten Konstrukte des c- myc- Promotors. Während die eine Zellpopulation das gesamte TIE- Element transfiziert bekam, wurden die anderen Zellen mit einer Mutante gegen die enthaltene NFAT- Bindungsstelle versehen. Die Grundbedingungen des Versuchsaufbaus wurden in Analogie zu den Versuchsreihen zuvor gewählt (24 Stunden Serumentzug vor Stimulationsbeginn).

Als Kontrollzellen wurden jene Zellen gewertet, die unter serumfreien Bedingungen den Wild- Typ der TIE- Domäne exprimieren. Sie wurden in ihrer Promotoraktivität gleich eins gesetzt.

Die Ergebnisse sprechen für einen relevanten Stellenwert von NFAT in der Regulation des c- myc- Promotors am TIE- Element.

Unter Verwendung einer Mutante der NFAT- Bindungsstelle im TIE- Element konnte in diesem Versuchsansatz die Relevanz von NFAT in der Induktion des „Immediate early“- Gens c- myc veranschaulicht werden. So lässt sich in wiederholter Weise eine Steigerung der Promotoraktivität von c- myc, vertreten durch das TIE- Element, unter Serumeinfluss registrieren (vierfacher Anstieg). Diese Aktivitätssteigerung wird durch das Fehlen der NFAT- Bindungsstelle deutlich unterbunden. Ebenfalls vermindert sich in den mutationstragenden Zellen die basale Promotoraktivität auf weniger als 50 % des ursprünglichen Wertes, der durch die serumfreien Wild- Typ- exprimierenden Zellen vorgeben wird.

Diese Ergebnisse standen somit im Sinne der zuvor formulierten Hypothese über die NFAT- vermittelte Induktion des c- myc- Promotors an seiner TIE- Domäne, so dass weiterführende Versuche diesen Sachverhalt mittels quantitativen und qualitativen Aussagen zum Verhältnis von NFAT an der TIE- Region genauer evaluieren sollten.

3.4.3. Der Einfluss des Transkriptionsfaktors NFAT auf die Expression des „Immediate early“- Gens c- myc

Anschließend an die vorangehenden Versuche, die NFAT in seinen physikalischen Eigenschaften an der TIE- Domäne des c- myc- Promotors darlegten, sollte im folgenden Experiment die Konsequenz dieser physikalischen Interaktion für die Induktion von c- myc überprüft werden. Als Versuchsansatz wurde hierfür eine zeitkinetische Expressionsreihe von c- myc unter dem Einfluss von NFAT aufgestellt. Unter dem Einsatz von siRNA gegen die mRNA des Transkriptionsfaktors NFAT sollte im Zellsystem Panc- 1 dieser Suppressions- Effekt auf die Expression von c- myc beobachtet werden. Die Zellen wurden vor Versuchsbeginn über 24 Stunden serumfrei gesetzt, um die Induktionseffekte von Serum optimal ausarbeiten zu können.

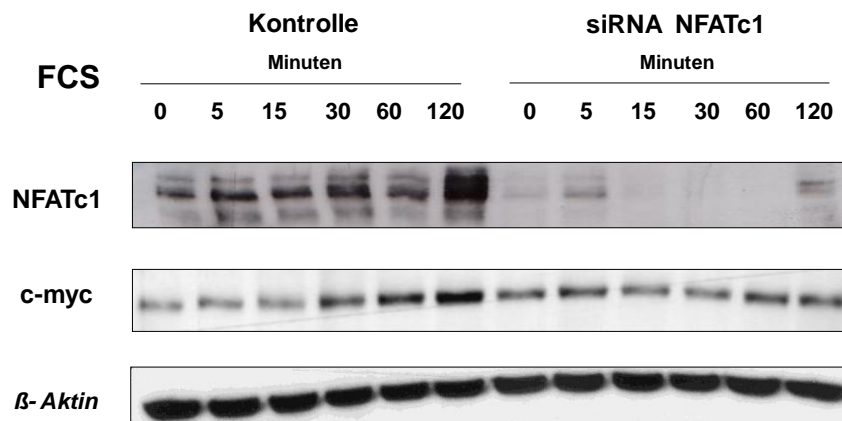


Abb. 30: Western- Blot- Analyse zum Einfluss von NFAT auf die Expression von c- myc

Den Zellen der Zelllinie Panc- 1 wurde für 24 Stunden vor Stimulationsbeginn (10 % FCS) Serum entzogen. Diese Konditionen entsprachen dem Zeitpunkt „0 Minuten“ in der Versuchsreihe. Es wurde in einem Zeitfenster von 120 Minuten mit Serum behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Proteinexpression für NFATc1 und c- myc in

Ab- und Anwesenheit von siRNA gegen NFATc1 im Gesamtzelllysat bestimmt. Als Kontrollzellen wurden Zellen angenommen, die lediglich mit einer unspezifischen und nicht zielgerichteten siRNA- Sequenz transfiziert wurden.

Als Ladungskontrolle diente der Nachweis von β - Aktin.

Es zeigt sich, dass mit der Suppression von NFATc1 die Induzierbarkeit von c- myc auf Proteinebene unterbleibt.

Unter Verwendung von siRNA gegen NFATc1 resultiert eine deutliche Beeinträchtigung der Induktion des „Immediate early“- Gens c- myc. In den Kontrollreihen, die lediglich mit einer unspezifischen und nicht zielgerichteten siRNA transfiziert wurden, kann sowohl für NFATc1 als auch in Analogie für c- myc, ein entsprechendes Induktionsmuster durch den Einsatz von Serum beobachtet werden. Auf die Induktionssteigerung von NFATc1 nach fünf Minuten folgt c- myc mit einer Steigerung seiner Expressionsrate nach 30 Minuten. Synchron erfahren beide Proteine nach 120 Minuten ihr Induktionsmaximum. Unter der Behandlung mit siRNA gegen NFATc1 verschwinden diese Induktionsmuster in beiden Proteinreihen. Die kaum noch erfassbare Expression von NFATc1 spricht hierbei für eine erfolgreiche Suppression durch die siRNA- Behandlung, während die deutlich eingeschränkte Induktion von c- myc als Folge hierauf zu verstehen ist.

Es scheint also, dass NFAT durch seine Bindung an die TIE- Domäne des c- myc- Promotors die Transkription des „Immediate early“- Gens beeinflusst. Neben der physikalischen Interaktion und der transkriptionellen Auswirkung sollte zum Abschluss der experimentellen Reihe dieser Arbeit noch die funktionelle Konsequenz der NFAT- induzierten c- myc- Expression untersucht werden. Ziel dieses letzten Versuches sollte es sein, den ursprünglichen Aspekt des Wachstumsverhaltens im Pankreaskarzinom erneut aufzugreifen und somit die Aussagekraft der durchgeführten Experimente unter dem Thema der „transkriptionellen Regulation mitogener ‚Immediate early‘- Gene im Pankreaskarzinom“ abzurunden.

3.4.4. Proliferationsanalysen zur Beurteilung der Relevanz des Transkriptionsfaktors NFAT für das Wachstumsverhalten von Pankreaskarzinomzellen

Bis zu diesem Zeitpunkt der Arbeit war zusammenfassend über das Wachstumsverhalten im Pankreaskarzinom erarbeitet worden, dass es Serum- abhängig induzierbar ist (Abb. 10), und dass eine Gruppe an „Immediate early“- Genen, allen voran c- myc, positiven Einfluss auf die Proliferationsrate von Pankreaskarzinomzellen besitzt (Abb. 17). In diesem letzten Abschnitt sollte es nun darum gehen, die zuvor erörterte Stellung von NFAT in der Serum- stimulierten Induktion des „Immediate early“- Gens c- myc mit dem funktionellen Prozess der Proliferationsregulation in Zusammenhang zu setzen.

Die Rolle von NFAT in der Zellproliferation wurde mit Hilfe der Methode des Thymidin- Assays und unter Einsatz von siRNA gegen NFAT zum Zweck seiner Suppression untersucht. Zur optimalen Ausarbeitung der Serumeffekte auf die Zellproliferation wurden die Zellen vor Versuchsbeginn für 24 Stunden unter Serumentzug gesetzt, um dann anschließend mit 10 % FCS stimuliert zu werden.

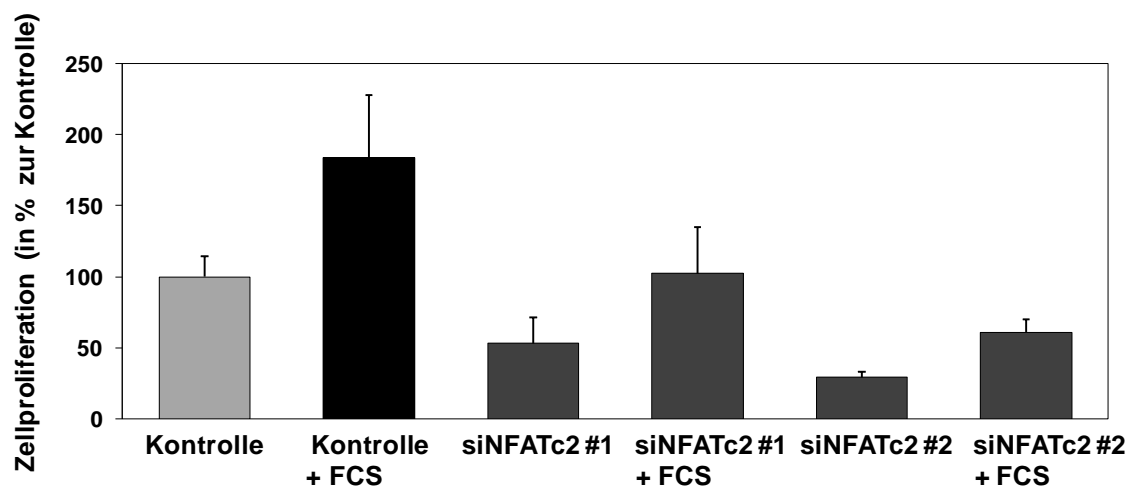


Abb. 31: Zellproliferationsanalyse mittels Thymidin- Assay zum Einfluss von NFAT

8988t- Zellen wurden durch Einbau des Isotops [H^3]- Thymidin in ihrem Serum- abhängigen Proliferationsverhalten unter dem Einfluss von NFAT untersucht. Die Versuchsreihe wurde mit einem Kontrollansatz ins Verhältnis gestellt, dessen Aktivität gleich 100 % gesetzt wurde. Als Kontrollzellen zählten jene Zellen, die unter

serumfreien Konditionen lediglich eine unspezifische und ziellose siRNA transfiziert bekamen. Als endogenes Bezugspaar zur Festlegung eines basalen Serum-Induktionswertes wurden Zellen unter den Konditionen der Kontrollzellen mit 10 % FCS stimuliert. Zur Beurteilung der Effekte von NFAT auf die Zellproliferation wurden zwei Versuchsansätze mit siRNA gegen NFATc2 gebildet (Sequenz #1 und Sequenz #2). Der Thymidin- Assay zeigt, dass durch Suppression von NFAT das Proliferationsverhalten der verwendeten Pankreaskarzinomzellen eingeschränkt wird.

Unter Verwendung von siRNA gegen NFATc2 konnte gezeigt werden, dass mit einem Verlust dieses Transkriptionsfaktors eine Reduktion der Proliferationsrate um die Hälfte einhergeht. Betrachtet man sich die Proliferationsinduktion durch Serum, so lässt sich im Vergleich zwischen den endogen NFAT- exprimierenden Zellen und den NFAT-supprimierten Zellen ein Abfall um mindestens 80 % erkennen, wobei der Induktionsreiz durch Serum auch bei den unter dem NFAT- Verlust leidenden Zellen weiterhin erhalten bleibt. Die Daten sind mit zwei verschiedenen Sequenzen des siRNA- Konstrukts getestet worden, die sich in ihren Resultaten entsprechen.

Zusammenfassend lässt sich somit ein Modell postulieren, demzufolge der Calcineurin-/ NFAT- Signalweg eine zentrale Rolle in der Induktion der mitogenen Zellzyklus-Progression ausübt, welche durch die transkriptionelle Induktion des „Immediate early“- Gens c- myc definiert wird.

4. Diskussion

4.1. Darstellung des Serum- vermittelten Wachstumsverhalten im Zellsystem des Pankreaskarzinoms unter der Regulation des „Immediate early“- Gens c- myc

Das Adenokarzinom des Pankreas stellt eine der aggressivsten malignen Erkrankungen des Menschen dar (Rosewicz und Wiedenmann 1997, Yeo et al. 2002). Sein onkogenes Potential zeichnet sich vorrangig durch sein extrem schnelles Wachstumsverhalten aus, das durch die Aktivierung onkogener Signalkaskaden getriggert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die transkriptionellen Mechanismen des Serum- induzierten Tumorwachstums im Pankreaskarzinom untersucht. Im Mittelpunkt standen hierbei der Ras- abhängige ERK- Signalweg und die Ras- unabhängige Calcium-/ Calcineurin- Signalkaskade. Beide Signalwege besitzen mitogene Eigenschaften und werden in der Literatur in verschiedenen Zellsystemen mit der Funktion der Wachstumsstimulation assoziiert (Roux und Blenis 2004; Lipskaia und Lompré 2004; Meloche und Pouysségur 2007; Mosieniak et al. 1998). Baksh und Mitarbeiter konnten beispielsweise in ihren Arbeiten zeigen, dass eine Stimulation der Calcium-/ Calcineurin- Signalkaskade in der Lage ist cdk 4, als eines der Schlüsselenzyme der G0/G1- S- Phasen- Zellzyklus- Progression, zu aktivieren (Baksh et al. 2000). Untermuert werden diese Resultate durch Arbeiten von Terada et al., die einen forcierten Eintritt der Zellen in den Zellzyklus nach Behandlung mit Ionomycin bzw. eine Hemmung dessen durch Gabe von CsA beobachten konnten (Terada et al. 1991). Der Wirkmechanismus von Ionomycin lässt sich durch einen erhöhten Calcium- Influx ins Zytoplasma erklären, der somit in indirekter Weise eine Steigerung der Calcineurin- Aktivität mit sich bringt (Rao et al. 1997). Cyclosporin A, kurz CsA, hingegen wirkt mittels direkter Interaktion mit der katalytischen Domäne von Calcineurin zur irreversiblen Hemmung der Aktivität dieser Serin/ Threonin- Phosphatase (Serfling et al. 2000; Crabtree 1999).

Der erste Schritt in der Induktion des Zellzyklus ist die rasche Induktion von „Immediate early“- Transkriptionsfaktoren, wie c- jun, c- fos, c- myc oder Egr- 1, die nach Induktion die Expression von Cyclinen und deren Aktivatoren regulieren (Murphy et al. 2003; Murphy et al. 2002). Im Zentrum dieser Arbeit stand die Identifikation und Charakterisierung relevanter Serum- regulierter „Immediate early“- Transkriptionsfaktoren im Pankreaskarzinom und deren Einfluß auf die Induktion des Zellzyklus. Unter Anwendung verschiedener funktioneller Assays, zur Messung des

Zellzyklus und der Zellproliferation, konnte gezeigt werden, dass Serum das Zellwachstum von Pankreaskarzinomzellen durch eine gesteigerte Zellzyklus-Progression stimuliert. Der zellzyklusfördernde Einfluss von Serum wurde durch ergänzende Versuche auf Proteinebene erweitert. Hierzu wurde die Expression von Cyclinen in einem zeitkinetischen Ansatz unter Serum- Stimulation dargestellt. Die Ergebnisse belegen, dass vor allem Cyclin D1 und Cyclin E Serum- abhängig induziert werden. Die Präsenz der verschiedenen Cycline zu den entsprechenden Phasen des Zellzyklus ist von essentieller Bedeutung für seine Steuerung. Denn von der Verfügbarkeit der jeweiligen Cycline ist die Aktivität ihrer Komplexbildungspartner, den Cyclin- abhängigen Kinasen (cdks), abhängig. Ihre katalytische Untereinheit ist wiederum nur dann aktiv, wenn sie mit der regulatorischen Untereinheit des entsprechenden Cyclins fusioniert. Ihren Einfluss auf den Zellzyklus durch Substatphosphorylierung können sie also lediglich im fusionierten Zustand wahrnehmen. Modifiziert werden kann diese Balance unter anderem durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren und Onkogenen (Shackelford et al. 1999).

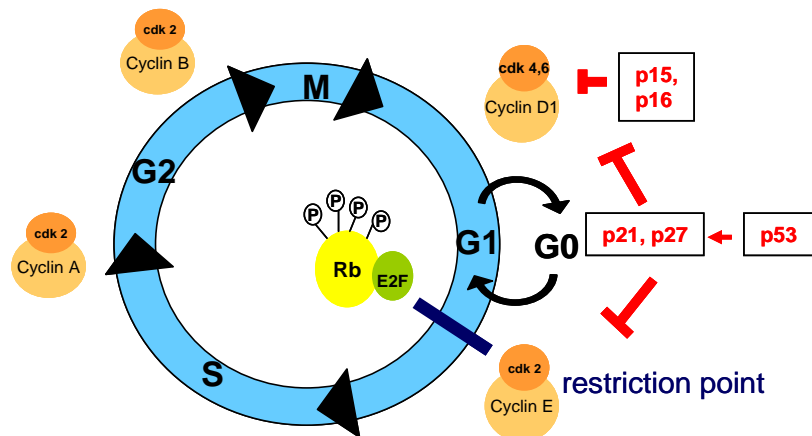


Abb. 32: Schematische Darstellung der Zellzyklusregulation

Abbildung 32 illustriert die Bedeutung der Cycline für die entsprechenden Zellzyklus-Phasen und verdeutlicht, dass Cyclin D1 vor allem in der G1-/ S- Phasen- Transition eine zentrale Rolle spielt. In Analogie hierzu konnten die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass Serum bevorzugt Cyclin D1 induziert, wodurch eine gesteigerte Progression des Zellzyklus in die S- Phase stimuliert wird. Weiterführende Experimente dienten der Identifikation jener „Immediate early“- Transkriptionsfaktoren, die in der

Vermittlung zwischen Serum und zellzyklusregulierenden Effekten involviert sind (Greenberg et al. 1985; Whitmarsh et al. 1995; Kaufmann et al. 2001; Murphy et al. 2002; Murphy et al. 2003; Meloche und Pouyssegur 2007). Zu „Immediate early“-Genen werden jene Gene bzw. ihre Produkte gezählt, die per Definition in ihrer Induktion keine Proteinneusynthese voraussetzen und somit in unmittelbarer Reaktion auf einen Stimulus stehen (Fambrough et al. 1999). In vielen Signalkaskaden finden sich IEG- Proteine als „third messenger“ zwischen Zelloberflächenrezeptoren, zytoplasmatischen „second messenger“- Molekülen und spezifischen Zielgenen der Kaskade wieder (Kieślting und Gass 1993). Prominente Vertreter der IEG- Proteine sind c- fos und c- jun (gemeinsam als AP-1- Molekül deklariert), c- myc und Egr- 1. Je nach Zellart und Induktionsstimulus nehmen IEG- Proteine an der Steuerung verschiedenster Zellfunktionen teil. Unter anderem unterstehen die Zelldifferenzierung, der Zellzyklus, das Zellwachstum und folglich die Zellproliferation ihrer Regulation (Murphy et al. 2002; Murphy und Blenis 2006). Häufig besteht eine Überexpression einzelner IEG- Proteine bei malignen Erkrankungen (Murphy und Blenis 2006). Speziell im Pankreaskarzinom scheint dabei c- myc von großer Bedeutung zu sein (Buchholz et al. 2006). Mittels Induktionsversuchen wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluß von Serum auf die Expression von „Immediate early“- Genen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in den Zelllinien Panc- 1 und 8988t getestet. Die resultierenden Expressionsmuster entsprachen ihrem definitionsgemäßen Charakter der sofortigen Induktion (Murphy et al. 2003). Dabei konnte im Besonderen für c- myc und Egr- 1 eine ausgeprägte Serum- Induktion festgestellt werden. Tatsächlich blieb die Expression von c- fos und c- jun auf Proteinebene von einer Stimulation mit Serum unbeeinflusst, während für c- myc und Egr- 1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine reproduzierbare Induktion gemessen werden konnte. Um die Relevanz der c- myc- und Egr- 1- Induktion für das Serum- stimulierte Zellwachstum im Pankreaskarzinom zu verifizieren, wurde ihre endogene Expression mit Hilfe der RNA- Interferentechnologie reprimiert und die funktionelle Konsequenz ihres Expressionsverlustes mittels Thymidin- Assay- Analysen untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass insbesondere die Induktion von c- myc von großer Bedeutung für das Wachstumsverhalten in Pankreaskarzinomzellen ist.

Die erstellten Daten zur Bedeutung von c- myc für die Zellproliferation befinden sich im Konsens mit zahlreichen Publikationen, die in unterschiedlichsten Zellsystemen den positiven Einfluss des „Immediate early“- Gens c- myc darstellen (Buchholz et al. 2006;

Amati et al. 1998; Claasesen und Hann 2000). C- myc wird in diesem Zusammenhang vorzugsweise von entscheidendem Einfluss auf die G1-/ S- Transition beschrieben, indem es G1- spezifische Cycline und Cyclin- abhängigen Kinasen (Cdks) in ihrer Expression steigert und Tumorsuppressions- Gene, wie p15, p21 und p27, inhibiert (Chambard et al. 2006; Claasesen und Hann 2000; Massagué 2004; Bouchard et al. 1999). Unklar bleibt, welche Signalkaskade zur Serum- abhängigen Wachstumsregulation im Pankreaskarzinom unter Einfluss des „Immediate early“- Gens c- myc beiträgt. Zur Erarbeitung dieses Regulationsmechanismus wurden die mitogenen Calcineurin- und Ras-/ ERK- Signalkaskaden in ihrer Relevanz unter Anwendung spezifischer Inhibitoren überprüft. Hierfür kamen Cyclosporin A (CsA), zur Unterdrückung der Calcineurin- Kaskade und U0126, zur Inhibierung des Ras-/ ERK- Signalweges, zum Einsatz. Cyclosporin A bindet hierfür an niedermolekulare intrazelluläre Rezeptoren, so genannten Immunophiline (spezifisch in Lymphozyten ist dies Cyclophilin A). Folglich unterbindet das entstandene Heterodimer in direkter Interaktion mit der katalytischen Domäne von Calcineurin irreversibel die Aktivität der Serin/Threonin- Phosphatase (Serfling et al. 2000; Crabtree 1999). Seinen therapeutischen Stellenwert erlangt Cyclosporin A vorrangig als Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin. Seinen zweiten Anwendungsbereich erfährt Cyclosporin A in der Therapie von Autoimmunerkrankungen. Im Gegensatz dazu wirkt U0126 in direkter Weise als allosterischer Hemmstoff in der Ras-/ ERK- Signalkaskade. U0126 bindet an das allosterische Zentrum von MEK 1/2 und hemmt somit spezifisch ERK in seiner Aktivität, da ERK das einzig bekannte Substrat von MEK 1/2 darstellt (Roberts und Der 2007; McCubrey et al. 2007). Unter Einsatz dieser Inhibitoren wurde die Bedeutung von Calcineurin für die Serum- abhängige Induktion von c- myc ersichtlich, da nach Applikation von CsA die Serum- induzierte Expression von c- myc ausblieb. Im Vergleich hierzu zeigte sich die c- myc- Proteinexpression und -Induktion von einer U0126- Behandlung unbeeinflusst. Calcineurin scheint also eine wichtige Rolle in der Serum- stimulierten Induktion von c- myc im Zellsystem des Pankreaskarzinoms zu spielen. Bekräftigt wird diese Aussage durch einen Calcineurin- Assay, der eine rasche Aktivierung von Calcineurin nach Serumbehandlung aufzeigen konnte. Aus der Literatur ist Calcineurin als eine Calcium- abhängige Phosphatase bekannt, die Calmodulin- abhängig als spezifische Serin/Threonin- Phosphatase fungiert (Stewart et al. 1982; Rao et al. 1997). Calcineurin wurde 1979 von der Arbeitsgruppe Klee als Calmodulin- bindendes Protein aus bovinem Hirn isoliert (Klee et al. 1979). Ihr Aufbau

besteht aus zwei Untereinheiten, der katalytischen und der regulatorischen Einheit. In Säugetieren existieren verschiedene Isoformen für die zwei Untereinheiten des Calcineurins, drei für die katalytische Calcineurin A- Untereinheit, CnA α , CnA β , CnA γ , und zwei für die regulatorische Einheit Calcineurin B, CnB1 und CnB2 (Feske et al. 2003; Tokoyoda et al. 1999). Um die Calcium- Abhängigkeit, der in den Mittelpunkt dieser Arbeit gestellten Calcineurin- Kaskade zu erörtern, wurden, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gudermann aus dem pharmakologischen Institut Marburg, Untersuchungen zur Messung der intrazellulären Calciumantwort auf Serum gemessen. Interessanterweise konnten diese Arbeiten zeigen, dass in Pankreaskarzinomzellen die Stimulation mit Serum zu einer sehr schnellen Zunahme der intrazellulären Calcium- Konzentration führt. Dabei stellt sich die Konzentrationszunahme nicht etwa als Folge eines erhöhten extrazellulären Einstroms von Calcium dar, sondern wird vielmehr durch eine Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum verursacht.

Zusammenfassend belegen diese Untersuchungen, dass Serum in Pankreaskarzinomzellen zu einer Aktivierung des Calcium-/ Calcineurin- Signalweges führt und dass dieser Signalweg von zentraler Bedeutung für die rasche Induktion des „Immediate early“- Transkriptionsfaktors c-myc und die sich hieraus ergebende Zellzyklusstimulation ist. Untersuchungen dieser Arbeit belegen ferner, dass die mitogene Ras- Raf- MEK- ERK- Signalkaskade nur eine untergeordnete Rolle in der Serum- induzierten Expression von c- myc spielt. Auch konnte keine Interaktion zwischen der ERK MAP- Kinase und der Calcineurin- Aktivierung im Pankreas als Antwort auf Serum festgestellt werden.

4.2. NFAT als Vermittler transkriptioneller Ereignisse in der Calcium-/ Calcineurin- abhängigen Induktion des „Immediate early“- Gens c- myc

Aus der Literatur bekannt für seine Calcineurin- abhängige Wachstumsregulation in malignen Zellsystemen ist der Transkriptionsfaktor NFAT, „nuclear factor of activated T- cells“ (Viola et al. 2005). Er wurde erstmals 1988/89 als mutmaßlicher Transkriptionsfaktor in nukleären Proteinextrakten aktivierter Jurkat T- Zellen beschrieben, in denen er an den humanen Interleukin- 2- Promotor bindet (Shaw et al. 1988). Aktuell umfasst die Familie der “nuclear factors of activated T- cells” fünf

Mitglieder: NFATc1- NFATc4 und NFAT 5/TonEBP (tonicity element binding protein)/ OREBP (osmotic response element binding protein), wobei die Zugehörigkeit letzteren aus später folgenden Gründen in der Literatur sehr kontrovers diskutiert wird. Aus diesem Grund beziehen sich die folgenden allgemein gefassten Aussagen im Wesentlichen auf die Mitglieder NFATc1- NFATc4. Diese lassen sich in ihrer schematischen Struktur insbesondere in vier verschiedene Regionen unterteilen: einer N- und C- terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD- A und -B), einer regulatorischen Domäne und einer DNA- bindenden Domäne. Die hochkonservierte DNA- Bindungsdomäne besteht aus annähernd 300 Aminosäuren, die unter den ersten vier Mitgliedern der NFAT Familie eine nahezu 70 %ige Homologie aufweist. Auf Grund ihrer strukturellen Verwandtschaft zur DNA- bindenden Domäne der Rel/ NF- κ B- Transkriptionsfaktoren, wird sie auch als Rel- ähnliche Domäne (Rel- similarity-domain, RSD) bezeichnet (Serfling et al. 2000). Proximal der DNA- Bindungssequenz liegt die regulatorische Domäne. Sie beherbergt eine Vielzahl Serin- reicher Motive (serine- rich domain, SRD), drei sogenannte SP- Motive (Serin- Prolin- Motive), eine nukleäre Lokalisationssequenz (nuclear localisation sequenz, NLS), eine nukleäre Exportsequenz (nuclear exporting sequenz, NES) und Calcineurin- Bindungsmotive, PxIxIT (Serfling et al. 2000; Crabtree 1999; Im und Rao 2004). Je nach Aktivierungszustand liegen die Serinreste der SP- Motive und der Serin- reichen Domänen im phosphorylierten bzw. im dephosphorylierten Zustand vor, was durch verschiedene Proteinkinasen und durch die heterodimäre Phosphatase Calcineurin bewerkstelligt wird (Crabtree 1999; Hogan et al. 2003). Umschlossen werden die DNA- Bindungssequenz und die regulatorische Einheit von den N- und C- terminalen Transaktivierungsdomänen (TAD- A und TAD- B). Durch alternatives Splicen dieser Domänen wird eine Expression unterschiedlicher Isoformen der NFAT- Mitglieder möglich (Rao et al. 1997; Serfling et al. 2000; Macian 2005).

Die Aktivierung und Translokation von NFAT erfolgt primär durch den Calcium-/ Calcineurin- Signalweg (Serfling et al 2000; Porter et al. 2000). Infolge erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} - Konzentrationen wird die Calcium-/ Calmodulin- abhängige Serin/ Threonin- Phosphatase Calcineurin aktiviert, woraufhin sie an das Calcineurin- bindende- Motiv, PxIxIT, von NFAT angelagert wird, das sich in der N- terminalen regulatorischen Domäne befindet (Crabtree 2000; Im und Rao 2004). Durch seine Bindung an NFAT leitet Calcineurin die Dephosphorylierung multipler Serin- Reste in der regulatorischen Domäne (SP- und Serin- reiche Motive) ein, infolgedessen es zu

einer Demaskierung der „nuclear localisation sequenz“ (NLS) und zu einer Erhöhung der Affinität von NFAT an seine Promotorsequenz GGAAA kommt. NFAT, gebunden an Calcineurin, wird mit Hilfe von Importin durch Kernporen in den Nukleus importiert und ist daraufhin in der Lage, mit anderen Transkriptionsfaktoren zu interagieren (Luo et al. 1996; Im und Rao 2004). Die Kooperation von NFAT mit anderen Transkriptionsfaktoren verstärkt seine geringe Eigenaffinität an die GGAAA-Promotorsequenz (Viola et al. 2005) und moduliert die Expression seiner Zielgene (Crabtree 1999; Macian 2005).

Limitiert wird die Aktivität von NFAT durch den Einsatz von nukleär lokalisierten „exportierenden Kinasen“ im Zellkern, die durch Phosphorylierung von Serin- Resten in „Serin- reichen Domänen“ oder SP- Motiven die Expression der „nuclear exporting sequenz“ fördern, was zur Aufhebung der NFAT- vermittelten Transkription führt. Zu ihnen gehören unter anderem GSK- 3 (Glykogensynthasekinase 3), CK- 1 (Casein-Kinase 1) und JNK (JUN N- terminal kinase) (Macian 2005; Okamura et al. 2004; Gomez et al. 2003). Crm- 1 (Chromosomal region maintenance 1) leitet ebenfalls eine Konformationsänderung des NFAT Moleküls ein. Es exportiert die „nuclear exporting sequenz“ und gewährleistet somit die Translokation in das Zytoplasma (Gomez et al. 2003).

Auch mittels pharmakologischer Hilfe kann die NFAT- Aktivierung (Dephosphorylierung, nukleäre Translokation, Erhöhung der DNA- Affinität) modifiziert werden. Als bedeutsamste Möglichkeit hierzu steht zur Inhibition Cyclosporin A (CsA) und Takrolimus/ FK506 und zur Aktivierung von NFAT über den Calcium-/ Calcineurin- Signalweg Ionomycin zur Verfügung (Rao et al. 1997).

NFAT5, das sich in seiner Struktur, DNA- Bindungseigenschaften und Regulation maßgeblich von den anderen vier Mitgliedern unterscheidet und vielmehr ein konstitutiv nukleäres und dimeres Phosphoprotein darstellt, ist dagegen unabhängig von Calcineurin durch osmotischen Stress aktivierbar und somit auch nicht in seiner Aktivierung durch CsA, FK506 oder Ionomycin modifizierbar (López- Rodríguez et al. 1999 und 2001).

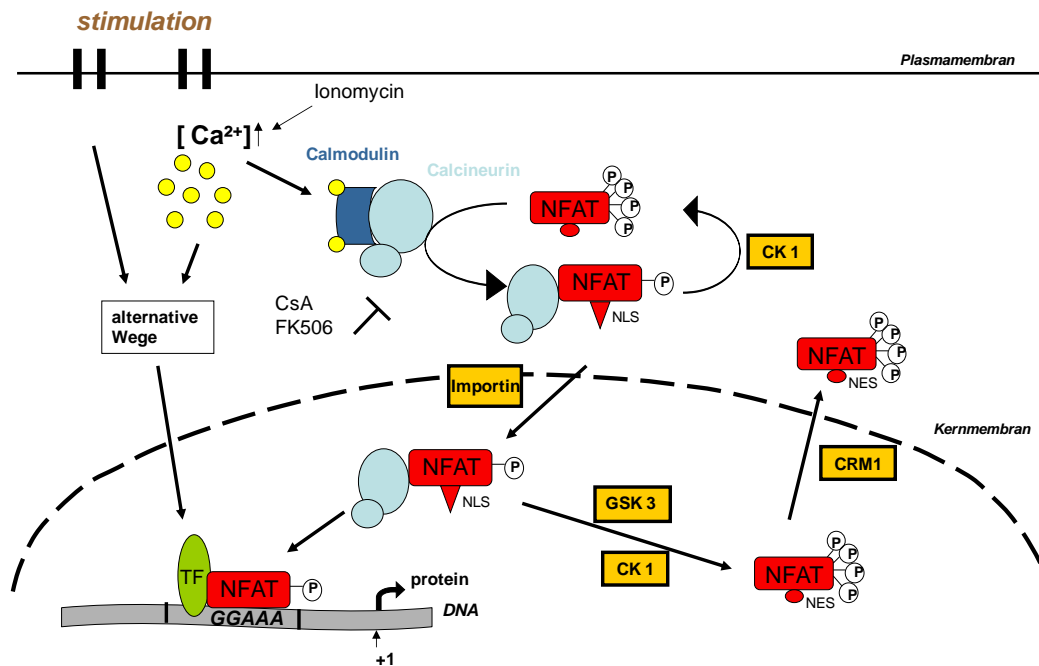


Abb. 33: Aktivierungs- und Deaktivierungskaskade des Transkriptionsfaktors NFAT

Zur Bedeutung der NFAT- Proteine in der Genese des Pankreaskarzinoms liegen nur wenige Daten vor. Mit Hilfe von Mikroarray- Analysen und RT- PCR konnte von Buchholz et al. eine Überexpression von NFATc1 in Pankreaskarzinomgewebe dargestellt werden (Buchholz et al. 2006). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe belegten das mindestens eines der Proteine NFATc1 oder NFATc2 in mehr als 90 % der Pankreaskarzinome nachgewiesen werden kann (n= 92) (Ellenrieder 2005, unveröffentlichte Befunde). Die Expression von NFAT beschränkt sich jedoch nicht nur auf maligne Stadien des Pankreasgewebe, sondern erstreckt sich bis in die Vorläuferstadien, den eingangs beschriebenen PanIN- Stadien. Zu diesen Ergebnissen kamen immunohistochemischen Färbungen, die NFATc2 bereits ab PanIN- Stadium 1B nachweisen und NFATc1 ab Stadium 2. Ihre Expression nimmt mit dem Fortschreiten der Vorläuferstadien zum invasiven Karzinom zu. Analoge Resultate konnten in ergänzenden in vitro Befunden zur NFAT- Überexpression auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien beobachtet werden (Buchholz et al. 2006; Ellenrieder 2005, unveröffentlichte Befunde für PanIN).

Des Weiteren zeigten genetische Untersuchungen in Pankreaszelllinien und -geweben in mehr als 80 % eine Genamplifikation von NFATc2 (Holzmann et al. 2004), wobei

anzumerken ist, dass DNA- Amplifikationen von Onkogenen zu den einflussreichsten genetischen Ereignissen zählen, die zur Entwicklung maligner Prozesse beitragen.

Basierend auf den vorliegenden Daten zur Expression der Calcineurin- responsiven Transkriptionsfaktoren NFATc1 und NFATc2 im Pankreaskarzinom und den Ergebnissen zur Calcineurin- abhängigen Induktion von c- myc in wachsenden Tumorzellen, konzentrierte sich der zweite Teil dieser Arbeit auf die Beantwortung der Fragen, ob NFATc1 und NFATc2 im Pankreaskarzinom durch Serum aktiviert werden und ob folglich diese Transkriptionsfaktoren von essentieller Bedeutung für die Serum- induzierte Expression von c- myc sind.

Tatsächlich konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz- Mikroskopie und ergänzend auf Proteinebene mittels Western- Blot- Analyse gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Serum zu einer raschen Translokation von NFAT in den Nukleus führt. DNA- Pulldown- Experimente konnten weiterhin eine Zunahme der Bindungsaffinität von NFAT an seiner Zielpromotorsequenz unter Serum nachweisen, so dass die Ergebnisse in sinnvoller Ergänzung zu den Serum- abhängigen Translokations- Untersuchungen stehen. Diese Resultate der Serum- induzierten Aktivierung, Translokation und DNA- Affinitätssteigerung von NFAT innerhalb kürzester Zeit entsprechen dem Induktionsmuster der „Immediate early“- Gene (Murphy et al. 2003) und fügen sich somit in das hypothetische Bild dieser Arbeit über eine „transkriptionelle Regulation mitogener ‚Immediate early‘- Gene im Pankreaskarzinom“ unter Einfluss von NFAT ein. In Analogie zu den Resultaten über die Regulation von c- myc zeigte sich in gleicher Weise für NFAT eine Serum- abhängige Regulation durch die Phosphatase Calcineurin. Für die Ras-/ ERK- Signalkaskade konnte kein erfassbarer Einfluss auf NFAT registriert werden. Die Serumeffekte auf die Expression von NFAT blieben unbeeinflusst, so dass im Weiteren von einer Serum- Regulation über den Calcineurin- Signalweg ausgegangen wurde (Crabtree 2000; Im und Rao 2004; Serfling et al. 2000). Letztlich wurde finalisierend die Bedeutung der NFAT- Proteine für die Serum- induzierte und Calcineurin- vermittelte Promotor- Induktion untersucht. Hierfür wurden zusätzliche Untersuchungen an einem NFAT- responsiven Promotor, cis- NFAT, angefertigt, die in Ergänzung zu den physikalischen Ergebnissen von NFAT an seiner DNA- Konsensussequenz standen, die mittels DNA- Pulldown- Technik erstellt wurden. Cis- NFAT beschreibt ein artifizielles Promotor- Konstrukt, das lediglich drei hintereinandergeschaltete NFAT-/ GGAAA- Bindungsstellen aufweist. Aufgrund dieser Promotoranalysen konnte daraufhin eine modellhafte Aussage über eine Steigerung der

Promotoraktivität durch NFAT unter dem Einfluss von Serum getroffen werden. Die Ergebnisse lassen sich jedoch nicht ohne Einschränkung auf die Ebene anderer Promotoren übertragen, auch wenn diese ebenfalls die perfekte NFAT-Bindungssequenz GGAAA beinhalten. Hierfür wäre es von Nöten, Ergebnisse, die lediglich am cis- NFAT- Promotor durchgeführt wurden, durch Promotoruntersuchungen mit entsprechenden Konstrukten, hier am c- myc- Promotor, zu vervollständigen.

In weiteren Experimenten, die der genaueren Charakterisierung des c- myc- Promotors dienten, erlaubte der Einsatz von Deletionskonstrukten, dass lediglich die DNA-Sequenz des „TGF β inhibitory element“ (TIE- Element) als Serum- responsive Promotorregion innerhalb des c- myc- Promotors identifiziert werden konnte. Das TIE- Element wurde erstmals 1990 von Kerr und Mitarbeitern im Gen der extrazellulären Matrixprotease, Stromelysin- 1, erkannt (Kerr et al. 1990). Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde das TIE- Element in Verbindung mit der TGF β - induzierten Wachstumshemmung gebracht. Chen und Mitarbeitern gelang es unter der Vorstellung, dass Tumorzellen häufig die Möglichkeit zur Wachstumshemmung über TGF β verloren haben, zu zeigen, dass die verminderte c- myc- Suppression in der Tumorprogression mit einem Verlust der Ansprechbarkeit auf TGF β einhergeht. Ebenfalls spielt das TIE- Element eine wichtige Rolle in der c- myc- Expression während der G1- Phase des Zellzyklus und somit, als Folge von Mutationen, in der Entstehung onkogener Prozesse (Chen et al. 2001; Yagi et al. 2002). Bezüglich des Transkriptionsfaktors NFAT wurde in der Literatur von Buchholz et al. 2006 die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NFAT („nuclear factor of activated T- cells“) in der TIE- Domäne, in der Nähe des P2 Transkriptionsstart- Punktes, genauer untersucht und NFATc1 mit der Regulation von c- myc in Kontext gestellt. Es wurde demnach angenommen, dass in einigen Pankreaskarzinomzelllinien die NFAT- vermittelte Steigerung der Proliferationsrate über die Induktion von c- myc und hier genauer gesagt über die Bindung an die TIE- Region im c- myc- Promotor, verläuft. Unter genauerer Betrachtung der Primärsequenz des TIE- Elements lassen sich neben einer Bindungsstelle für NFAT auch noch Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren anderer unterschiedlichster Gruppen, unter anderem Smad- 3, Sp1 und E2F, erkennen (Abb. 34).

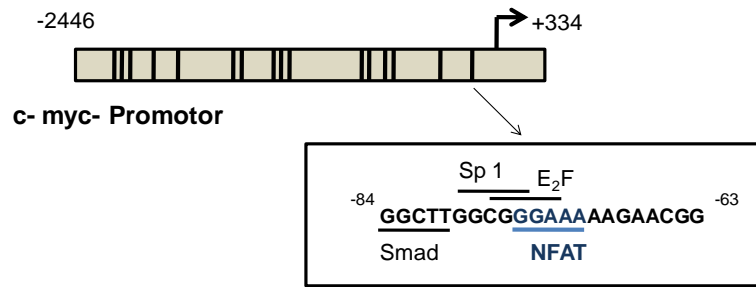


Abb. 34: Schematische Darstellung des c- myc Promotors (nach Buchholz et al. 2006)

Weiterführende Versuchen konnten in Anlehnung an vorherige Ergebnisse unter Anwendung des Calcineurin- Inhibitors Cyclosporin A (CsA) den Einfluss der Calcium-/ Calcineurin- Kaskade auf die Serum- abhängige Induktion des c- myc- Promotors über das TIE- Element dargelegt. Zur Erörterung der transkriptionellen Relevanz von NFAT an der TIE- Domäne des c- myc- Promotors konnte, mit Hilfe von Luziferase- Promotor- Analysen und unter Einsatz einer NFAT- Bindungsstellen- Mutante innerhalb der TIE- Domäne, die bedeutende Stellung von NFAT in der Serum- abhängigen Induktion des TIE- Elements ausgearbeitet werden. Anzumerken bleibt an dieser Stelle, dass der c- myc- Promotor selbstverständlich weitere NFAT- Bindungsstellen neben derjenigen in der TIE- Region aufweist. In Anlehnung an die durchgeführten Promotoruntersuchungen, anhand von Deletionskonstrukten des c- myc- Promotors, scheinen diese jedoch nicht von entscheidender Relevanz zu sein.

Zur weiteren Aufarbeitung der Hypothese, dass c- myc NFAT- vermittelt über die TIE- Domäne, auf dem Boden einer Regulation durch den Serum- stimulierten Calcium-/ Calcineurin- Signalweg, induziert wird, wären weiterführende qualitative und quantitative Promotoranalysen über die TIE- Region des c- myc- Promotors zu erstellen, die mit Hilfe des Luziferase- Reporter- Assays und der DNA- Pulldown- Technik erzielt werden könnten. Die Ergebnisse würden die notwendige Erweiterung von zuvor durchgeführten Reporter- und DNA- Pulldown- Analysen darstellen, in denen ein cis- NFAT- Promotor eingesetzt wurde, dessen Einsatz jedoch lediglich zu exemplarischen Aussagen befähigt ist.

Unter Einsatz von siRNA, zur Unterdrückung der Genexpression von NFAT, wurde die Konsequenz der physikalischen Interaktion von NFAT mit der TIE- Domäne im Bezug auf die Induktion von c- myc im Western- Blot- Verfahren erkennbar, wenn diese mit einem Verlust von NFAT entsprechend unterblieb. Schlussendlich wurde in einem

finalen Experiment ein Proliferationsassay angesetzt, der die Bedeutung von NFAT in der Proliferationsregulation belegt (Viola et al. 2005).

Zusammenfassend ist es somit zum Ende dieser Arbeit möglich, ein Bild über das Wachstums- und folglich über das Proliferationsverhalten des untersuchten Zellsystems des Pankreaskarzinoms zu skizzieren, das ein Serum- abhängiges Wachstumsverhalten unter der Calcium-/ Calcineurin- NFAT- regulierten Kontrolle des „Immediate early“- Gens c- myc am TIE- Element beschreibt (Abb. 35).

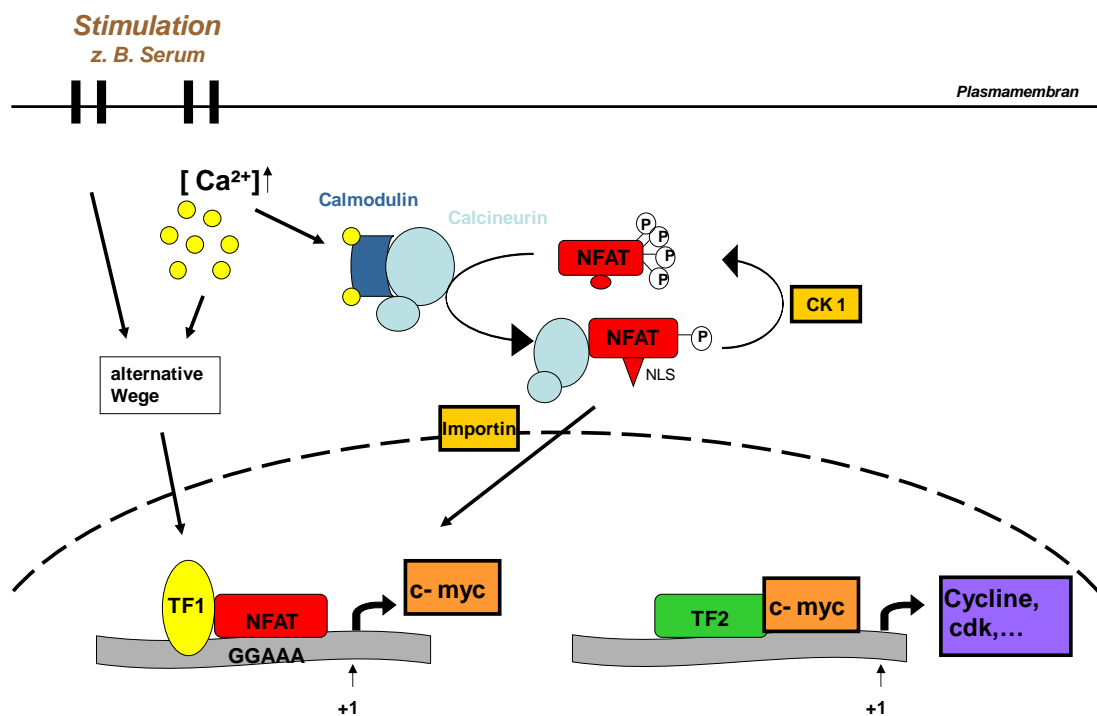


Abb. 35: Schematische Darstellung der Serum- abhängigen Calcium-/ Calcineurin regulierten „transkriptionellen Induktion des mitogenen ,Immediate early‘- Gens c- myc“ zum Ziel der Wachstumsbeeinflussung im Pankreaskarzinom
TF: Transkriptionsfaktor

4.3. Bedeutung und Ausblick

Das Wachstumsverhalten des Pankreaskarzinoms beschreibt einen der aggressivsten Prozesse unter den malignen Erkrankungen des Menschen (Rosewicz und Wiedenmann 1997; Yeo et al. 2002). Schon innerhalb früher genetischer Alterationen in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms, in sogenannten PanIN- Stadien, lassen sich die

Transkriptionsfaktoren c- myc und NFAT identifizieren. C- myc gehört zur Transkriptionsfaktor- Familie der „Immediate early“- Gene und wird in der Literatur in engem Zusammenhang mit mitogenen Prozessen über eine Forcierung der G1-/ S- Transition beschrieben (Amati et al. 1998; Claasesen und Hann 2000). Als Serum-abhängiger Induktor der c- myc- Expression konnte im Rahmen dieser Arbeit über die Signal- Kaskade von Calcineurin der Transkriptionsfaktor NFAT ausgemacht werden, dem ebenfalls wachstumsfördernde Eigenschaften in onkogenen Entwicklungen zugesprochen werden (Viola et al. 2005; Buchholz et al. 2006).

Anzumerken bleibt an dieser Stelle, dass die Initiation von transkriptionellen Prozessen stets durch einen komplexen Zusammenschluss verschiedener Transkriptionsfaktoren organisiert wird. Folge dessen ist eine Verstärkung der DNA- Eigenaffinität der einzelnen Transkriptionsfaktoren, die an die DNA binden, und eine entsprechend modifizierte Expression der Zielgene, die sich nach den beteiligten Komplexbildnern richtet.

So wird auch für den in dieser Arbeit beschriebene Prozess „der transkriptionellen Regulation mitogener ‚Immediate early‘- Gene im Pankreaskarzinom“ davon ausgegangen, dass dieser nicht alleine durch NFAT reguliert wird, sondern in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren geschieht, zumal die Kooperation von NFAT mit anderen Transkriptionsfaktoren zur Steigerung seiner geringen Eigenaffinität an der GGAAA- DNA- Promotorsequenz unerlässlich ist (Viola et al. 2005). Ideale Voraussetzung für eine Interaktion von NFAT mit weiteren Transkriptionsfaktoren schafft die hoch flexible Struktur seiner Bindungsdomäne (Macian 2005). In der Literatur zählt als populärster Interaktionspartner von NFAT das „Immediate early“- Gen AP- 1 (c- jun und c- fos) (Rao et al 1997; Zhou et al. 2001; Chen et al. 1998; Macian 2005). Weitere Partnerproteine, die beschrieben werden, sind MEF2, GATA, histone deacetylases (HDACs), EGR-1 und EGR-4, MAF, CREB und viele weitere (Im und Rao 2004; Macian 2005; Sato et al. 2006; Wu et al. 2007). In weiterführenden Arbeiten soll dieser Aspekt, der Interaktion von NFAT mit Partnerproteinen zur „transkriptionellen Regulation mitogener ‚Immediate early‘- Gene im Pankreaskarzinom“, vertieft werden. Erste Ergebnisse konnten von unserer Arbeitsgruppe für die mitogenen Transkriptionsfaktoren CREB („cAMP response element- binding protein“) und Elk- 1 („Ets- like protein- 1“), als Mitglied der Familie der Ets- Transkriptionsfaktoren, erzielt werden, die ebenso wie NFAT mit der Induktion von „Immediate early“- Genen in der Literatur in Verbindung gebracht werden (Murphy

und Blenis 2006). Vorrangiges Augenmerk soll hierbei in Zukunft auf der physikalischen und funktionellen Interaktion zwischen diesen potentiellen Fusionspartnern und NFAT zur Induktion von c- myc, als Vertreter der „Immediate early“- Gene, liegen. Zur Bewerkstellung dieser Fragestellungen wird unter anderem die Technik der Co- Immunpräzipitation, der mikroskopischen Immunfluoreszenz, des Luziferase- Promotor- Assays, des DNA- Pulldowns und des ChIP- Assays (Chromatin- Immunpräzipitations- Assay) herangezogen werden. Zusätzlich soll der Frage nachgegangen werden, über welchen Signalweg diese Interaktion reguliert wird. Für beide Faktoren, CREB und Elk-1, finden sich in der aktuellen Literatur vorwiegend Angaben über eine Regulation über den Signalweg der MAP- Kinasen zur raschen Induktion von „Immediate early“- Genen wieder (Rao et al 1997; Seger und Krebs 1995; Murphy und Blenis 2006). Die bisherigen Arbeitsergebnisse lassen bis dato jedoch in Analogie der NFAT- Signalkaskade mittels Western- Blot- Technik, eine Regulation von CREB und Elk- 1 ebenfalls über Serum und über die Phosphatase Calcineurin erkennen. So soll durch weitführende Untersuchungen dieser Art erreicht werden, dass ein komplexes Erklärungsbild über die Interaktionspartner von NFAT zur Induktion des c- myc- Promotors skizziert werden kann, das mit dem hier beschriebenen Mechanismus der Serum- abhängigen Calcineurin-/ NFAT- regulierten Induktion von c- myc an der TIE- Domäne, in sinnvollem und ergänzendem Zusammenhang steht.

5. Zusammenfassung

5.1. Zusammenfassung

Das Adenokarzinom des Pankreas zeichnet sich vorrangig durch sein aggressives Wachstumsmuster aus. Die Prognose für Patienten mit inoperablen Stadien beläuft sich auf einen medianen Überlebenszeitraum von lediglich vier bis sechs Monaten (Greer et al. 2007). Diese infauste Prognose wird unter der Beachtung, dass zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die Möglichkeit zu kurativ operativen Therapieansätzen bei lokal begrenztem Tumorbefund lediglich noch bei 10- 20 % liegt, noch einmal deutlicher (Rosewicz und Wiedenmann 1997, Yeo et al. 2002).

Zum besseren Verständnis des molekularbiologischen Hintergrunds für dieses Wachstumsphänomen wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, ein differenziertes Erklärungsbild über „die transkriptionelle Regulation mitogener ‚Immediate early‘- Gene im Pankreaskarzinom“ mit der funktionellen Folge einer Wachstumsinduktion abzulegen. Hierzu wurde der Frage nachgegangen, welche Signalkaskade und anschließenden transkriptionellen Mechanismen an der forcierten G1-/ S- Transition maßgeblich beteiligt sind. Als etablierte Stimulans konnte Serum die Induktion von Zellwachstum und -proliferation bewerkstelligen und als Induktor der „Immediate early“- Gene c- myc und Egr- 1 gezeigt werden. Für die funktionelle Eigenschaft des Zellwachstums scheint c- myc als Vertreter der „Immediate early“- Gene große Relevanz zu besitzen, da unter Suppression seines Genprodukts eine massive Abnahme der Proliferationsrate zu beobachten war. Als regulierende Signalwege wurden in diesem Zusammenhang primär zwei mitogene Kaskaden verifiziert, die Ras- abhängige Ras- Raf- MEK- ERK- Kaskade und der Ras- unabhängige Calcineurin- Signalweg. Durch Anwendung von pharmakologischen Hemmstoffen und weiteren Versuchsmethoden konnte unter anderem in Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg die Bedeutung der Ras- unabhängigen Calcium-/ Calcineurin- Kaskade für die Induktion von c- myc zur Wachstumsregulation aufgezeigt werden. Weiterführende Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene konnten NFAT, „nuclear factor of activated T- cells“, als bekannten mitogenen Transkriptionsfaktor, integrieren. Schlussendlich konnte für NFAT eine Serum- abhängige Aktivierung und Translokation in den Nukleus und darüberhinaus eine Erhöhung seiner DNA- Bindungsaffinität mit

Zunahme der Promotoraktivität gezeigt werden. Die Ergebnisse wurden zuerst an einer NFAT- responsiven DNA- Sequenz (cis- NFAT) demonstriert und im Folgenden auf spezifische Promotoranalysen von c- myc übertragen. An dieser Stelle konnte mittels detaillierter c- myc- Promotoranalysen die sogenannte TIE- Domäne, „TGF β inhibitory element“, für die NFAT- abhängige Induktion von c- myc zur Regulation von wachstumsregulierenden Prozessen verantwortlich gemacht werden.

Zusammenfassend führte diese Arbeit zu einem besseren Verständnis des Wachstumsverhaltens in Pankreaskarzinomzellen. So dass folglich ein Modell postuliert wird, demzufolge der Calcineurin-/ NFAT- Signalweg eine zentrale Rolle in der Induktion der mitogenen Zellzyklus- Progression ausübt, welche durch die transkriptionelle Induktion des „Immediate early“- Gens c- myc definiert wird. Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine zentrale Rolle der NFAT- Aktivierung in der initialen Phase der Zellzyklusinduktion des Pankreaskarzinoms aufgezeigt werden.

5.2. Abstract

Adenocarcinoma of the pancreas is known primarily because of its aggressive growth pattern. Patients with an inoperable state of this disease have a cumulative survival rate of only four to six months (Greer et al. 2007). This prognosis becomes even more evident when taken into consideration that the possibility for curative operative therapy approaches in locally restricted tumor statement only 10- 20 % at the time of the diagnosis (Rosewicz und Wiedenmann 1997, Yeo et al. 2002).

For a better understanding of the biomolecular background of this growth phenomenon, this thesis attempted to create a differentiated explanation of “the transcriptional regulation of mitogenic ,Immediate early‘- genes of pancreatic cancer“ with the functional consequence of growth induction. The question was which signaling cascade and associated transcriptional mechanisms are of particular relevance for increased G1-/ S- phase cell cycle transition. As an established stimulant serum caused the induction of cell- growth and resulted in an increased cell proliferation. It could be shown that serum is an inducer of “Immediate early“- genes c- myc and Egr- 1. It seems that c- myc, representative for “Immediate early“- genes, has a central importance for the functional qualities of cell growth, because after suppression of its gene product a massive decrease of proliferation could be observed. In this context two primary mitogenic signaling cascades have been verified in detail, the Ras- dependent Ras- Raf- MEK- ERK- signaling cascade and the Ras- independent Calcineurin- signaling pathway. In cooperation with the pharmacological and toxicological institute of the University of Marburg, among others, the importance of the Ras- independent Calcium-/ Calcineurin- signaling pathway for the induction of c- myc in context with the growth regulation could be demonstrated by using pharmacological inhibitors as well as other established methods. Further analyses on transcriptional levels were able to integrate NFAT, “nuclear factor of activated T- cells“, as an established mitogenic transcription factor. Finally, it was possible to show activation and nuclear translocation of NFAT in response to serum treatment and also an increase of DNA- binding affinity followed by an augmentation of the promoter activity. These results have been demonstrated at first by using a NFAT responsive reporter construct (cis- NFAT) and in the following it has been assigned on specific promoter analyses of c- myc. Using detailing c- myc- promotor analyses it was possible to show that the so- called TIE-domain, „TGF β

inhibitory element“, is responsible for NFAT- dependent induction of c- myc for growth regulation.

In summary, this thesis provided a better understanding of the growth regulation of pancreatic cancer. As a result, a model can be postulated that Calcineurin-/ NFAT- signaling pathway plays an important part in cell- cycle progression which is selected by transcriptional induction of the „Immediate early“- gene c- myc. It was possible to demonstrate the central part of NFAT in the initial phase of cell- cycle induction of pancreatic cancer for the first time.

6. Literaturverzeichnis

- Amati B, Alevizopoulos K, Vlach J (1998): *Myc and the cell cycle*. Front Biosci 3: 250-268
- American Cancer Society (2007): *Cancer facts and figures*. American Cancer Society, Atlanta, Georgia, USA
- Baksh S., DeCarprio J. A., Burakoff S. J. (2000): *Calcineurin regulation of the mammalian G0/G1 checkpoint element, cyclin dependent kinase*. Onkogene 19: 2820-2827
- Blackwood E. M., Eisenman R. N. (1991): *Max: a helix- loop- helix zipper protein that forms a sequence- specific DNA- binding complex with Myc*. Science 251 (4998): 1211- 1127
- Bos J. L. (1989): *Ras oncogenes in human cancer: a review*. Cancer Res. 49: 4682-4689
- Bourchard C., Thieke K., Maier A., Saffrich R., Hanley- Hyde J., Ansorge W. et al. (1999): *Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27*. EMBO J 18: 5321- 5333
- Bradford, M.M. (1976): *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72, 248- 254.
- Buchholz M., Schatz A., Wagner M., Michl P., Linhart T., Adler G., Gress TM, Ellenrieder V. (2006): *Overexpression of c- myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/ Calcineurin pathway*. EMBO J. 25: 3714- 3724
- Calogero, A., Arcella, G. De Gregorio, A. Porcellini, et al. (2001): *The early growth response gene EGR-1 behaves as a suppressor gene that is down-regulated independent of ARF/Mdm2 but not p53 alterations in fresh human gliomas*. Clin. Cancer Res. 7 (9): 2788- 2796

- Cao X., Koski R. A., Gashler A., McKiernan M., Morris C. F., Gaffney R., Hay R. V., Sukhatmel V. P. (1990): *Identification and Characterization of the Egr-1 Gene Product, a DNA-Binding Zinc Finger Protein Induced by Differentiation and Growth Signals*. Molecular and Cellular Biology Vol. 10, No 5: 1931- 1939
- Chambard J.- C., Lefloch R., Pouyssegur J., Lenormand P. (2006): *ERK implication in cell cycle regulation*. Biochimica et Biophysica Acta 1773; 1299– 1310
- Chen C. R., Kang Y., Massague J. (2001): *Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 992- 999
- Chen L., Glover J. N., Hogan P. G., Rao A., Harrison S.C. (1998): *Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA*. Nature 392 (6671): 42- 48
- Chowdhury P, MacLeod S, Udupa KB, Rayford PL. (2002): *Pathophysiological effects of nicotine on the pancreas: an update*. Exp Biol Med (Maywood). 227 (7): 445- 454
- Claassen G. F., Hann S. R. (2000): *A role for transcriptional repression of p21^{CIP1} by c-Myc in overcoming transforming growth factor β - induced cell- cycle arrest*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 9498- 9503
- Cole M. D. und McMahon S. B.(1999): *The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation*. Oncogene 18, 2916- 2924
- Coller H. A. , Grandori C., Tamayo C., Colbert T., Lander E. S., Eisenmann R. N. et al. (2000): *Expression analyses with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 3260- 3265
- Cornwall G. A., Collis R., Xiao Q., Hsia N., Hann S. R. (2001): *B-Myc, A Proximal Caput Epididymal Protein, Is Dependent on Androgens and Testicular Factors for Expression*. Biology of Reproduction 64, 1600– 1607
- Crabtree G. R. (1999): *Generic Signals and Specific Outcomes: Signaling through Ca²⁺, Calcineurin, and NF-AT*. Cell 96, 611- 614

- Dang C. V. (1999): *C- Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism*. Molecular and cellular biology 19: 1- 11
- Ellenrieder V. (2005): Klinik für Innere Medizin, Gastroenterologie, Universitätsklinik Marburg, unveröffentlichte Befunde
- Facchini L. M. und Penn L. Z. (1998): *The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights*. FASEB J. 12, 633- 651
- Fambrough D., McClure K., Kazlauskas A., Lander E. S. (1999): *Diverse Signaling Pathways Activated by Growth Factor receptors Induce Broadly Overlapping, Rather Than Independent, Sets of Genes*. Cell 97, 727- 741
- Freske S., Okamura H., Hogan P. G. und Rao A. (2003): *Ca²⁺/ Calcineurin signalling in cells of the immun system*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 311, 1117- 1132
- Gashler A, Sukhatme VP (1995): *Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 50:191- 224
- Gentz R., Rauscher F. J. 3rd, Abate C., Curran T. (1989): *Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains*. Science 243 (4899): 1695- 1699
- Gomez MF, Bosc LV, Stevenson AS, Wilkerson MK, Hill-Eubanks DC, Nelson MT (2003): *Constitutively Elevated Nuclear Export Activity Opposes Ca²⁺- dependent NFATc3 Nuclear Accumulation in Vascular Smooth Muscle*. J. Biol. Chem. 278(47): 46847- 46853
- Greenberg M, Greene L, Ziff E. (1985): *Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells*. J Biol Chem. 260 (26): 14101-14110
- Greer J, Whitcomb D, Brand R. (2007): *Genetic predisposition to pancreatic cancer: a brief review*. Am. J. Gastroenterol. 102 (11): 2564- 2569
- Hallberg B., Rayter S. I., Downward J. (1994): *Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation*. J. Biol. Chem. 269: 3913- 3916

- Hermeking H., Rago C., Schuhmacher M., Li Q., Barrett J. F., Obaya A. J. Et al. (2000): *Identification of CDK4 as a target of c- MYC*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 2229- 2234
- Hochheimer A und Tijan R (2003): *Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression*. Genes Dev 17: 1309- 1320.
- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003): *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin and NFAT*. Genes Dev. 17: 2205- 2232
- Holzmann K, Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Kestler HA, Schwoerer A, Rau B, Radlwimmer B, Dohner H, Lichter P, Gress T, Bentz M (2004): *Genomic DNA-chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes*. Cancer Res 64: 4428- 4433
- Howe GR, Jain M, Burch JD, Miller AB. (1991): *Cigarette smoking and cancer of the pancreas: evidence from a population-based case-control study in Toronto, Canada*. Int. J. Cancer 47 (3): 323- 328
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE (2000): *Progression model for pancreatic cancer*. Clin. Cancer Res. 6: 2969- 2972
- Huang R.- P., Fan Y., De Belle I., Niemeyer C., Gottardis M. M., Mercola D., Adamson E. D. (1997): *Decreased Egr- 1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation*. Int. J. Cancer 72, 102- 109
- Im S.- H. und Rao A. (2004): *Activation and Deactivation of Gene Expression by Ca^{2+} / Calcineurin- NFAT- mediated Signaling*. Mol. Cells 18, 1- 9
- Janssen K.-P. (2003): *Murine models of colorectal cancer: studying the role of oncogenic K-ras*. Cell. Mol. Life Sci. 60: 495- 506
- Karin M., Liu Z., Zandi E. (1997): *AP-1 function and regulation*. Curr. Opin. cell biol. 9 (2): 240- 246

- Kaufmann K, Bach K, Thiel G (2001): *The extracellular signal-regulated protein kinases ERK1/ERK2 stimulate expression and biological activity of the transcriptional regulator Egr-1*. Biol. Chem. 382: 1077- 1081
- Kerr LD, Miller DB, Matrisian LM (1990): *TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence*. Cell. Apr 20; 61 (2): 267- 278
- Kiessling M., Gass P. (1993): *Immediate early gene expression in experimental epilepsy*. Brain Pathol. 3, 381- 393
- Kinzler K. W., Vogelstein B. (1996): *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell 87: 159- 170
- Klee CB, Crouch TH und Krinks MH (1979): *CaN: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6270- 6273
- Lee M. und Park J. (2006): *Regulation of NFAT Activation: a Potential Therapeutic Target of Immunosuppression*. Mol. Cell 22, 1- 7
- Lionetto, R.; Pugliese, V.; Bruzzi, P.; Rosso, R. (1995): *No standard treatment is available for advanced pancreatic cancer*. Eur. J. Cancer 31, 882- 887
- Lipskaia L. und Lompré A. M. (2004): *Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation*. Biology of the Cell 96: 55- 68
- López- Rodríguez C., Aramburu J., Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A. (2001): *Bridging the NFAT and NF- κB Families: NFAT5 Dimerization Regulates Cytokine Gene Transcription in Response to Osmotic Stress*. Immunity. 15 (1): 47- 58
- López- Rodríguez C., Aramburu J., Jin L, Rakeman AS, Rao A. (1999): *NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 96(13): 7214- 7219
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L. (1993): *Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer*. N. Engl. J. Med.; 328 (20): 1433- 1437

- Luo C., Shaw K. T.- Y., Raghavan A., Aramburu J., Garcia- Cozar F., Perrino B. A., Hogan P. G., Rao A. (1996): *Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import*. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(17): 8907- 8912
- Macian F., Garcia-Rodriguez C., und Rao A. (2000): *Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun*. EMBO J. 19: 4783- 4795
- Massagué J. (2004): *G1 cell- cycle control and cancer*. Nature Vol 432 (7015): 298- 306
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. (2007): *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. Biochim. Biophys. Acta. 1773 (8): 1263- 1284
- Meloche S. und Pouyssegur J. (2007): *The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition*. 26 (22): 3227- 3239
- Mosieniak G., Pyrzynska B., Kaminska B. (1998): *Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a new component of the signal transduction pathway in glioma cells*. J. Neurochem. 71: 134- 141
- Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE (1997): *P16 and K- Ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma*. Cancer research 57: 2140- 2143
- Murphy L. O. und Blenis J. (2006): *MAPK signal specificity: the right place at the right time*. Trends Biochem. Sci. 31, 268- 275
- Murphy L. O., MacKeigan J. P. und Blenis J. (2003): *A Network of Immediate Early Gene Products Propagates Subtle Differences in Mitogen- Activated Protein Kinase Signal Amplitude and Duration*. Mol. Cell. Biol. 133- 153

- Murphy L. O., Smith S., Chen R.- H., Fingar D. C., Blenis J. (2002): Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.* 4, 556- 564
- Neher E. und Sakmann B. (1976): *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers.* *Nature* 260: 799- 801
- Okamura H., Garcia- Rodriguez C., Martinson H., Qin J., Virshup DM, Rao A. (2004): *A conserved docking motif for CKI binding controls the nuclear localisation of NFAT1.* *Mol. Cell Biol.* 24 (10): 4184- 4195
- Pellegata N. S., Sessa F., Renault B., Bonato M., Leone B. E., Solcia E., Ranzani G. N. (1994): *K-ras and p53 gene mutation in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumour progress through different lesions.* *Cancer Res.* 54: 1556- 1560
- Porter AC und Vaillancourt RR. (1998): *Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis.* *Oncogene* 17: 1343- 1352
- Porter CM, Havens MA, Clipstone NA. (2000): *Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization.* *J. Biol. Chem.* 275: 3543- 3551
- Pouyssegur J., Volmat V., Lenormand P. (2002): *Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling.* *Biochem. Pharm. Pharmacol. Accl.* 64: 755- 763
- Prendergast G.C. und Ziff E.B. (1991): *Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-myc basic region.* *Science* 251, 186- 189
- Ragione F. D., V. Cucciolla V. Criniti S. Indaco et al. (2003): *p21Cip1 gene expression is modulated by Egr1: a novel regulatory mechanism involved in the resveratrol antiproliferative effect.* *J. Biol. Chem.* 278 (26): 23360- 23368
- Rao A., Luo C. und Hogan PG (1997): Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 15, 707- 747
- Roberts PJ und Der CJ. (2007): *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer.* *Oncogene.* 26 (22): 3291- 3310

- Rosewicz S. und Wiedenmann B. (1997): *Pancreatic carcinoma*. Lancet 15; 349 (9050): 485- 489
- Roux PP. und Blenis J. (2004): *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68 (2): 320- 344
- Sato K, Suematsu A, Nakashima T, Takemoto-Kimura S, Aoki K, Morishita Y, Asahara H, Ohya K, Yamaguchi A, Takai T, Kodama T, Chatila TA, Bito H, Takayanagi H (2006): *Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway*. Nature medicine 12: 1410- 1416
- Scharnhorst, V., A. L. Menke, J. Attema, J. K. Haneveld, et al., (2000): *EGR-1 enhances tumor growth and modulates the effect of the Wilms' tumor 1 gene products on tumorigenicity*. Oncogene 19 (6): 791- 800
- Schleger C, Verbeke C, Hildenbrand R, Zentgraf H, Bleyl U (2002): *c- Myc activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoms of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance*. Mod. Pathol. 15 (4), 462- 469
- Seger R. und Krebs E.G. (1995): *The MAPK signaling cascade*. FASEB J. 9, 726- 735
- Sells SF, Muthukumar S, Sukhatme VP, Crist SA, Rangnekar VM. (1995): *The zinc finger transcription factor EGR-1 impedes interleukin-1- inducible tumor growth arrest*. Mol. Cell Biol. 15 (2): 682- 692
- Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, Avots A. (2000): *The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation*. Biochim Biophys Acta. 1498(1): 1- 18
- Shackelford R., Kaufmann W., Paules R. (1999): *Cell Cycle control, Checkpoint Mechanisms, and Genotoxic Stress*. Enviroment health perspectives. Environ Health Perspect. 107 Suppl 1: 5- 24
- Shaulian E. und Karin M. (2001): *AP-1 in cell proliferation and survival*. Oncogene 20, 2390- 2400

- Shaw J. P., Utz P. J., Durand D. B., Toole J. J., Emmel E. A. und Crabtree G. R. (1988): *Identification of a putative regulator of early T cell activation genes*. Science 241: 202- 205
- Shields J. M., Pruitt K., McFall A., Shaub A., Der C. J. (2000): *Understanding Ras: it ain't over til it's over*. Cell Biol. 10: 147- 154
- Simon P., Fehrenbach E. und Niess A. M. (2006): *Regulation of immediate early gene expression by exercise: Short cuts for the adaptation of immune function*. Exerc. Immunol. Rev.12, 112- 131
- Staller P., Peukert K., Kiermaier A., Seoane J., Lukas J., Karsunky H., Moroy T., Bartek J., Massague J., Hanel F. und Eilers M. (2001): *Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1*. Nat. Cell. Biol. 3: 392
- Stewart AA, Ingebritsen TS, Manalan A, Klee CB und Cohen P (1982): *Discovery of a Ca²⁺- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with CaN (CaM-BP80)*. FEBS Letters 137, 80- 84
- Sukhatme, V. P. (1990): *Early Transcriptional Events in Cell Growth: The Egr Family*. J. Am. Soc. Nephrol. 1: 859- 866
- Sukhatme, V. P. (1991): *The Egr family of nuclear signal transducers*. Am. J. Kidney. Dis. 17 (6): 615- 618
- Terada N, Lucas JJ, Gelfand EW (1991): *Differential regulation of the tumor suppressor molecules, retinoblastoma susceptibility gene product (Rb) and p53, during cell cycle progression of normal human T cells*. J. Immunol. 147 (2): 698- 704
- Tokoyoda K., Takemoto Y., Nakayama T., Arai T., Kubo M. (1999): *Synergism between the Calmodulin- binding and Autoinhibitory Domains on Calcineurin Is Essential for the Induction of Their Phosphatase Activity*. J. Biol. Chem. 275 (16): 11728- 11734
- Towbin, H. Staehelin T, Gordon J. (1979): *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 4350- 4354

- Trahey M., McCormick F. (1987): *A cytoplasmic protein stimulates normal N c N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants.* Science 238: 542- 545
- Viola JP, Carvalho LD, Fonseca BP, Teixeira LK (2005): NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. Braz J Med Biol Res. 38 (3): 335- 344
- Virolle, T., A. Krones-Herzig, V. Baron, G. De Gregorio, Adamson ED, Mercola D. (2003): *Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes.* J. Biol. Chem. 278 (14): 11802- 11810
- Waters C.M., Littlewood T.D., Hancock D.C., Moore J.P., Evan G.I. (1991): *cmyc protein expression in untransformed fibroblasts.* Oncogene 6, 797- 805
- Whitmarsh, A.J., Shore, P., Sharrocks, A.D., und Davis, R.J. (1995): *Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element.* Science 269, 403- 407
- Wu H., Peisley A., Graef I. A., Crabtree G. R. (2007): *NFAT signaling and the invention of vertebrates.* Trends Cell Biol. 17(6): 251- 260
- Yagi K, Furuhashi M, Aoki H, Goto D, Kuwano H, Sugamura K, Miyazono K, Kato M (2002): *c-myc is a downstream target of the Smad pathway.* J. Biol. Chem. 277 (1): 854-61
- Yang W. S. J., Wu M, Arsura M, Fitz Gerald M., Suldan Z., Kim DW, Hofmann CS, Pianetti S., Romieu- Mourez R., Freedman LP, Sonenshein GE (2001): *Repression of transcription of the p27 (Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc.* Oncogene 20: 1688
- Yeo T. P., Hruban R. H., Leach S. D., Wilentz R. E., Sohn T. A., Kern S. E., Iacobuzio-Donahie C. A., Maitra A., Goggins M., Canto M. I., Abrams R. A., Laheru D., Jaffee E. M., Hidalgo M., Yeo C. J. (2002): *Pancreatic cancer.* Curr. Probl. Cancer 4: 176- 275
- Zhou B., Cron R. Q., Wu B., Genin A., Wang Z., Liu S., Robson P., Baldwin H. S. (2002): *Regulation of the murine Nfatc1 gene by NFATc2.* The Journal of Biological Chemistry 277, 10704- 10711

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Pankreasprogressionsmodell (Hruban et al. 2000)
Abbildung 2	Schematische Darstellung der MAP- Kinasen Aktivierungskaskade über Rezeptor- Tyrosinkinasen
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Calcium-/ Calcineurin- Kaskade über Rezeptor- Tyrosinkinasen
Abbildung 4	Schematische Darstellung der third messenger- Gruppe der „Immediate early-“ Gene als Vermittler zwischen cytoplasmatischen Kaskaden und ihren Zielgenen
Abbildung 5	Struktur des MEK1/2- Inhibitors U0126
Abbildung 6	Struktur des Calcineurin- Inhibitors Cyclosporin A
Abbildung 7	Oxidative Decarboxylierungs- Reaktion von Luziferin zu Oxyluziferin
Abbildung 8	Oxidations- Reaktion von Coelenterazin zu Coelenteramid
Abbildung 9	Prinzip der Chemilumineszenzreaktion
Abbildung 10	Zellproliferationsanalyse mittels Thymidin- Assay zum Einfluss von Serum
Abbildung 11	Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie zum Einfluss von Serum
Abbildung 12	Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie durch zeitkinetische Stimulations-ansätze mit FCS
Abbildung 13	Western- Blot- Analyse zur Serum- induzierten Cyclin- Expression
Abbildung 14	„Real- Time- PCR“ zur Serum- regulierten „Immediate early“- Gen- Induktion im Panc- 1- Zellsystem
Abbildung 15	„Real- Time- PCR“ zur Serum- regulierten „Immediate early“- Gen- Induktion im 8988t- Zellsystem
Abbildung 16	Western- Blot- Analyse zur Überprüfung der Induzierbarkeit von ausgewählten IEG- Proteinen durch den Einfluss von Serum
Abbildung 17	Zellproliferationsanalyse mittels Thymidin- Assay ausgewählter „Immediate early“- Gene (Egr- 1 (A) und c- myc (B)) ergänzt durch Western- Blot- Analysen

- Abbildung 18 Western- Blot- Analyse zur Induzierbarkeit von c- myc unter Einfluss von Serum über die Zeit in der Pankreaskarzinomzelllinie 8988t
- Abbildung 19 Western- Blot- Analyse zur Überprüfung des Einflusses der Ras-/ ERK- und Calcium-/ Calcineurin- Kaskade auf die nukleäre Expression von c- myc in Panc- 1 (A) und 8988t (B)
- Abbildung 20 Calcineurin- Assay zur Bestimmung der Phosphatasen- Aktivität unter dem Einfluss von Serum
- Abbildung 21 Immunfluoreszenz- mikroskopische Darstellung der endogenen NFAT- Lokalisation unter dem Einfluss von Serum
- Abbildung 22 Western- Blot- Analyse zur Untersuchung des Serumeinflusses auf die intrazelluläre NFATc2- Lokalisation
- Abbildung 23 DNA- Pulldown- Assay zur Untersuchung des Verhaltens des Transkriptionsfaktors NFAT an der spezifischen Konsensusregion GGAAA unter dem Einfluss von Serum
- Abbildung 24 Western- Blot- Analyse zur Überprüfung des Einflusses der Ras-/ ERK- und Calcium-/ Calcineurin- Kaskade auf die nukleäre Expression des Transkriptionsfaktors NFAT
- Abbildung 25 NFAT- Promotoraktivitäts- Analysen mittels Luziferase Reporter Gen Assay unter dem Einfluss von Serum
- Abbildung 26 Luziferase Reporter Gen Assay zur funktionellen Strukturuntersuchung des c- myc- Promotors unter Serumeinfluss
- Abbildung 27 Luziferase Reporter Gen Assay zur funktionellen Untersuchung des „TGF β inhibitory element“ des c- myc- Promotors
- Abbildung 28 Luziferase Reporter Gen Assay zur Untersuchung des Einflusses der Calcium-/ Calcineurin- Kaskade auf die Induktion des „TGF β inhibitory element“ des c- myc- Promotors
- Abbildung 29 Luziferase Gen Promotor Assay zur Untersuchung der transkriptionellen Relevanz von NFAT für die Induktion von c- myc über die TIE- Domäne
- Abbildung 30 Western- Blot- Analyse zum Einfluss von NFAT auf die Expression von c- myc
- Abbildung 31 Zellproliferationsanalyse mittels Thymidin- Assay zum Einfluss von NFAT
- Abbildung 32 Schematische Darstellung der Zellzyklusregulation

- Abbildung 33 Aktivierungs- und Deaktivierungskaskade des Transkriptionsfaktors NFAT
- Abbildung 34 Schematische Darstellung des c- myc Promotors (nach Buchholz et al. 2006)
- Abbildung 35 Schematische Darstellung der Serum- abhängigen Calcium-/ Calcineurin regulierten „transkriptionellen Induktion des mitogenen ‚Immediate early‘- Gens c- myc“ zum Ziel der Wachstumsbeeinflussung im Pankreaskarzinom

7.2. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1 Beschreibung/ Eigenschaften, Kulturmedium und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien
- Tabelle 2 Verwendete DNA- Vektoren
- Tabelle 3 Verwendete siRNA- Konstrukte
- Tabelle 4 Verwendete Luziferase- Promotorkonstrukte
- Tabelle 5 Verwendete Effektorplasmid- Konstrukte
- Tabelle 6 Verwendete Primer zur „quantitativen Real- Time- PCR“
- Tabelle 7 Verwendete Primärantikörper zur Western- Blot- Analyse
- Tabelle 8 Verwendete Sekundärantikörper zur Western- Blot- Analyse
- Tabelle 9 Verwendete Primärantikörper der Immunfluoreszenzfärbung
- Tabelle 10 Verwendete Sekundärantikörper der Immunfluoreszenzfärbung

7.3. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AP- 1	Activator protein- 1
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	Activating transcription facors
ATP	Adenosintriphosphat
B- myc	Brain expressed v- myc myelocytomatosis viral oncogene homologue
bHLH- Zip	Basischen Helix- Loop- Helix- Leucin- Zipper
BRCA- 2	Breast cancer susceptibility gene 2
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
c- fos	C- fos oncogene
c- jun	C- jun- oncogene
c- myc	Myc myelocytomatosis viral oncogene homologue
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
cdk	Cyclin dependent kinase
cDNA	Complementary Desoxyribonukleinsäure
ChIP	Chromatin- Immunpräzipitation
CK- 1	Casein- Kinase 1
Cn	Calcineurin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	C- AMP response element binding protein
Crm- 1	Chromosomal region maintenance 1
CsA	Cyclosporin A
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerol

DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindolhydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPC4	Deleted in pancreatic carcinoma, locus 4
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E- Boxen	Enhancer- Boxen
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
Egr-1	Early growth response- 1
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
Elk-1	Ets-like protein- 1
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Ets	E twentx- six (avian virus)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FK506	Takrolimus
for	Forward
G- Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GSK	Glycogen- synthetase- kinase
GSK- 3	Glykogensynthasekinase 3
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H ₂ O	Wasserstoffdioxid
HDAC	Histone deacetylase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethansulfonsäure
HER-2/ neu	Human epidermal growth factor receptor 2
His	Histamin
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IEG	Immediate early gene

IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1, 4, 5- trisphosphat
JDP	Jun dimerization partners
JNK	JUN N- terminal kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
L- myc	Lung carcinoma derived v- myc myelocytomatosis viral oncogene
M	Mol
mA	Milliampere
Maf	Muscuoaponeurotic fibrosarcoma
MAPK	Mitogen- activated protein kinase
Max	Myc- associated factor
mCi	Millicurie
MEF2	Mouse- Embryonic Fibroblast
MEK	MAPK/ ERK kinase
ml	Milliliter
mM	Mikromol
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mRNA	Messenger RNA
mut	Mutiert
N- myc	Neuroblastoma derived v- myc myelocytomatosis viral oncogene
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₄ P ₂ O ₇	Tetranatriumdiphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumflourid
NaOH	Natriumhydroxid
NC	Nitrocellulose
NES	Nuclear exporting sequenz
NFAT	Nuclear factor of activitated T-cells
NFκB	Nuclear factor kappa B
NLS	Nuclear localisation sequenz
nm	Nanometer

nt	Nukleotid
OD 620 nm	Optische Dichte von 620 nm
OREBP	Osmotic response element binding protein
p38	38 kDa protein kinase
PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasias
PBS	Phosphate- buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pERK	Phosphoryliertes ERK
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4, 5)- biphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3, 4, 5)- triphosphat
PxIxIT	Calcineurin- bindende- Motiv von NFAT
PLC	Phospholipase C
pmol	Pikomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Raf	Rat fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
Rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA- interferenz
rpm	Rounds per minute
RSD	Rel- similarity- domain
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
s. o.	Siehe oben
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat
SH2	Src homology 2
siRNA	Small- interferenz RNA
SMAD4-	Signalling mother against decapentaplegic peptide
SOS	Son of sevenless
SP- Motiv	Serin- Prolin- Motiv
SRD	Serine- rich domain
SRF	Serum response factor
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
Syk	Spleen tyrosine kinase

T- Zellen	Thymus-abhängige Zellen/ Lymphozyten
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered Saline Tween 20
TCA	Trichloracid
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGFβ	Transforming growth factor beta
TIE	TGFβ inhibitory element
TonEBP	Tonicity element binding protein
Tris	Tris-hydroxyl- methyl- aminomethan
Triton X 100	Alkylphenylpolyethylenglykol
Tween 20	Polyoxymethylensorbitan- monolaurat
U0126	1,4- diamino- 2,3- dicyano-1,4- bis(2- aminophenylthio) butadien
UV	Ultraviolett
V	Volt
WCL	Whole cell lysat
wt	Wildtyp
z. B.	Zum Beispiel

7.4. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer aus Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Dr. Adolph, Prof. Dr. Aigner, PD Dr. Albert, Dr. Al Kadah, Dr. Alpmann, PD Dr. Alter, Prof. Dr. Aumüller, Dr. Bahr, PD Dr. Dr. Bals, Dr. Barth, Prof. Dr. Barth, PD Dr. Bartsch, Prof. Dr. Dr. Basler, PD Dr. Bastians, Prof. Dr. Bauer, Dr. Bauer, Prof. Dr. Baum, Dr. Baumann, Prof. Dr. Becker, Prof. Dr. Behr, PD Dr. Benes, Prof. Dr. Berger, Prof. Dr. Besedovsky, PD Dr. Bette, Prof. Dr. Bien, Dr. Bock, PD Dr. Boeckhoff, Dr. Bolm, PD Dr. Braun, Prof. Dr. Brehm, Dr. Breit, Dr. Büch, PD Dr. Buchholz, Dr. Burbelko, PD Dr. Burchert, Dr. Busch, Prof. Dr. Cetin, Prof. Dr. Christiansen, Dr. Chubanov, Prof. Dr. Czubayko, Prof. Dr. Dr. Daut, Prof. Dr. Del Rey, PD Dr. Dietrich, Dr. Dinges, PD Dr. Dominguez, Prof. Dr. Donner-Banzhoff, Dr. Duda, Dr. Ebel, Prof. Dr. Eberhart, Prof. Dr. Eilers, PD Dr. Ellenrieder, Prof. Dr. Elsässer, Prof. Dr. Engenhardt- Cabillic, PD Dr. Feiber, Dr. Fensterer, PD Dr. Fritz, Prof. Dr. Fuchs-Winkelmann, Dr. Funck, Prof. Dr. Garten, Dr. Geks, Prof. Dr. Gerdes, Prof. Dr. Görg, PD Dr. Graf, Prof. Dr. Gress, Prof. Dr. Grimm, PD Dr. Groß, Dr. Grundmann, Prof. Dr. Grzeschik, Prof. Dr. Gudermann, Prof. Dr. Hadij, Prof. Dr. Hamer, Prof. Dr. Hasilik, PD Dr. Hassan, Dr. Hegele, Dr. Hellmeyer, Prof. Dr. Hellwig, Dr. Helwig- Rolig, Prof. Dr. Hermann- Lingen, Prof. Dr. Hertl, PD Dr. Herzum, PD Dr. Höffken, Dr. Hörle, Dr. Hoffmann, Prof. Dr. Hofmann, PD Dr. Hofstaetter, Prof. Dr. Hoyer, Dr. Iwinska-Zelder, Dipl. Jacke, Dr. Jackowski- Dohrmann, Prof. Dr. Jacob, PD Dr. Jaques, Dr. Kalder, PD Dr. Kalinowski, Prof. Dr. Kann, Dr. Kanngiesser, Dr. Käuser, Dr. Kerwat, Dr. Kill, Dr. Kim- Berger, Prof. Dr. Klaus, Prof. Dr. Klenk, Prof. Dr. Kingmüller, Prof. Dr. Koch, Prof. Dr. Klose, PD Dr. Köhler, Prof. Dr. Köhler, Prof. Dr. König, Dr. Köster, Prof. Dr. Koolmann, PD Dr. Krebber, Prof. Dr. Kretschmer, Prof. Dr. Krieg, Prof. Dr. Kroh, Prof. Dr. Kroll, PD Dr. Krones, PD Dr. Kühnert, Prof. Dr. Kuhlmann, Dr. Kwee, Prof. Dr. Langer, Dr. Lemke, PD Dr. Leonhardt, Dr. Likoyiannis, Prof. Dr. Lill, Prof. Dr. Liß, Prof. Dr. Löffler, Prof. Dr. Loff, Prof. Dr. Lohoff, PD Dr. Lüers, Dr. Lukasewitz, Prof. Dr. Maier, Dr. Maier, Prof. Dr. Maisch, PD Dr. Maisner, Dr. Malek, Dr. Dr. Mandrek, Dr. Mann, PD Dr. Martin, Dr. Martinovic, Dr. Mederos Y Schnitzler, PD Dr. Mennel, Dr. Merte, PD Dr. Michl, PD Dr. Mittag, Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Moosdorf, Prof. Dr. Dr. Mueller, PD Dr. Müller, Prof. Dr. Müller, PD Dr. Mühlberger,

Prof. Dr. Mutters, Dr. Nachtigall, Prof. Dr. Neubauer, Prof. Dr. Oertel, Dr. Olbert, Prof. Dr. Pagenstecher, Dr. Pfützner, Prof. Dr. Pieper, Prof. Dr. Plant, Dr. Pressel, PD Dr. Printz, PD Dr. Quante, Dr. Ramaswamy, Dr. Rausch, Dr. Reichel, Prof. Dr. Renz, Prof. Dr. Richter, Dr. Riera-Knorrenschild, Dr. Rohlf, Prof. Dr. Röhm, Dr. Rolfes, PD Dr. Rominger, Prof. Dr. Röper, Prof. Dr. Rose, Prof. Dr. Rosenow, Prof. Dr. Rothmund, Dr. Rybinski, Dr. Sattler, Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schmidt, Prof. Dr. Schmidt, PD Dr. Schmitt, Dr. Schmitz, Prof. Dr. Schnabel, Prof. Dr. Schneider, Dr. Schierl, Dr. Schofer, PD Dr. Schrader, Dr. Schulze, Prof. Dr. Schultz, Prof. Dr. Seitz, PD Dr. Sesterhenn, Dr. Shiratori, Dr. Skrzypek, Dr. Skwara, Dr. Steinkamp, Prof. Dr. Steiniger, PD Dr. Stiletto, Dr. Stiller, PD Dr. Straßmann, Prof. Dr. Strempel, Prof. Dr. Sure, Prof. Dr. Suske, PD Dr. Tebbe, PD Dr. Teymoortash, PD Dr. Torossian, Dr. Varga, Prof. Dr. Vogelmeier, Prof. Dr. Voigt, Prof. Dr. Wagner, Prof. Dr. Waldegger, Dr. Walthers, Prof. Dr. Weihe, Prof. Dr. Werner, PD Dr. Westermann, Prof. Dr. Wiegandt, PD Dr. Wilhelm, Dr. Wollmer, Dr. Wündisch, Prof. Dr. Wulf, Dr. Zemelin, Dr. Zettl, Dr. Zwioerek

Meine akademischen Lehrer aus Frankenberg waren die folgenden Damen und Herren:

Dr. Assmann, Dr. Cassebaum, Dr. Hüttich, Dr. Kohler, Hr. Lorenz, Fr. Schalk, Dr. Schmid, Dr. Wagner

Meine akademischen Lehrer aus St. John's, Neufundland, waren die folgenden Damen und Herren:

Dr. Cluett, Dr. Felix, Dr. Fitzpatrick, Dr. Gardiener, Dr. Jewer, Dr. Kwan, Dr. Mann, Dr. McClellan, Dr. Melvin, Dr. Pace, Dr. Pollett, Dr. Rideout

Meine akademischen Lehrer aus Zürich, Schweiz, waren die folgenden Damen und Herren:

Dr. Dinges, Prof. Dr. Eberli, Dr. Flury, Dr. Frick, Dr. Gmür, Dr. Hack, PD Dr. Kurz, Dr. Laifer, Prof. Dr. Meier, Dr. Reinle, Dr. Richner, Dr. Ritter, Dr. Siciliano, Dr. Simons, Dr. Stuber, Dr. Thalmann, Dr. Tüller, Dr. Zbinden

7.5. Danksagung

Ich möchte allen danken, die auf verschiedene Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Th. M. Gress danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut diese Arbeit zu erstellen.

Ganz herzlich danke ich PD Dr. med. Volker Ellenrieder für die Überlassung der Thematik dieser Arbeit, die hervorragende Betreuung und die allseitige Unterstützung in den doch manchmal sehr verschlungenen Wegen. Seine Geduld scheint unermüdlich zu sein! Danke!

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gudermann und seiner Arbeitsgruppe des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Marburg für ihre freundliche Zusammenarbeit im Rahmen dieser Arbeit.

Desweiteren gilt mein besonderer Dank Dr. Alexander König und Dr. Thomas Linhart für ihre stets fröhliche und unterstützende Art bei der Arbeit im Labor.

Hervorheben möchte ich auch meinen Dank an Kristina Reutlinger, der „guten Seele“ unseres Labors, die mit ihrem Engagement und ihrer Hilfsbereitschaft das heitere Laborklima maßgeblich mitprägt.

Mein unaussprechbarer Dank gilt Manuela Malsy- eine bessere Mitstreiterin hätte ich mir nicht vorstellen können! Ich danke ihr für ihre Freundschaft und ihre rückenstärkende, motivierende, hilfsbereite und einfach wunderbare Art!

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern in unserm Laborbereich für das angenehme Arbeitsklima, für die gute Zusammenarbeit und für die vielen Tipps und Hilfestellungen. Ich danke an dieser Stelle sehr Harald Schmidt, mit dem ich so einige Zeit mit der Durchführung von FACS- Analysen verbracht habe und Tilmann Rachner für die gemeinsame Zeit im Labor.

Vanessa Enk danke ich sehr für ihr kritisches, geduldiges und unverzichtbares Korrekturlesen dieser Promotions- Arbeit und von Herzen für ihre Freundschaft!

An dieser Stelle möchte ich auch die Gelegenheit nutzen, meinen Eltern von ganzem Herzen dafür zu danken, dass es sie gibt! Ich danke ihnen, dass sie mir mein Studium ermöglicht und mir immer alle Freiheiten gelassen haben. Ich danke ihnen für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ihre Freundschaft und ihre einmalige Art!

Nils, ich danke dir unendlich für deine bereichernde Art und die Zeit, die ich mit dir zusammen teilen darf!

7.6. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Transkriptionelle Regulation mitogener ‚Immediate early‘- Gene im Pankreaskarzinom“ im medizinischen Zentrum für Innere Medizin Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel unter Leitung von Professor Dr. med. Th. M. Gress ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wird in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

A. König, T. Linhart, K. Schlengemann, K. Reutlinger, J. Wegele, G. Adler, G. Singh, L. Hofmann, S. Kunsch, T. Büch, E. Schäfer, T. M. Gress, M. E. Fernandez- Zapico, V. Ellenrieder (2009): *NFAT- induced histone acetylation relay switch promotes c- myc- dependant growth in pancreatic cancer cells*. Gastroenterology

Marburg, den

(Katrín Schlengemann)